



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12N 15/34, 15/86, C07K 14/075, C12N 5/10, 7/00, A61K 48/00</b>		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 98/44121</b> (43) Date de publication internationale: 8 octobre 1998 (08.10.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00668 (22) Date de dépôt international: 2 avril 1998 (02.04.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/03987 2 avril 1997 (02.04.97) FR 97/04747 17 avril 1997 (17.04.97) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANS- GENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Stras- bourg (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LEGRAND, Valérie [FR/FR]; 40, boulevard Balzac, F-67200 Strasbourg (FR). MEHTALI, Majid [FR/FR]; 16, impasse de Reims, F-67400 Illkirch Graffenstaden (FR). BOULANGER, Pierre [FR/FR]; 6, rue Maguelone, F-34000 Montpellier (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regim- beau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).			(81) Etats désignés: AU, CA, JP, SG, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>
(54) Title: MODIFIED ADENOVIRAL FIBER AND TARGET ADENOVIRUSES (54) Titre: FIBRE ADÉNOVIRALE MODIFIÉE ET ADENOVIRUS CIBLES (57) Abstract <p>The invention relates to an adenovirus fiber modified by the mutation of one or more residues. The residues are directed towards the natural cell receptor in the three-dimensional structure of said adenovirus. The invention further relates to a DNA fragment, and expression vector, and a cell line expressing said fiber, and also concerns an adenovirus, the process for producing this type of adenovirus, and a infectable host cell, as well as their therapeutic application and a corresponding pharmaceutical composition.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention a pour objet une fibre d'un adénovirus modifiée par mutation d'un ou plusieurs résidus, lesdits résidus étant dirigés vers le récepteur cellulaire naturel dudit adénovirus au niveau de la structure tridimensionnelle. Elle concerne également un fragment d'ADN, un vecteur d'expression ainsi qu'une lignée cellulaire exprimant ladite fibre. Enfin, elle a trait à un adénovirus la comprenant, le procédé pour produire un tel adénovirus et une cellule hôte infectable ainsi qu'à leur usage thérapeutique et une composition pharmaceutique correspondante.</p>			

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	PT	Portugal		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SD	Soudan		
DK	Danemark	LR	Libéria	SE	Suède		
EE	Estonie			SG	Singapour		

## FIBRE ADENOVIRALE MODIFIEE ET ADENOVIRUS CIBLES.

La présente invention a pour objet une fibre adénovirale mutée dans les régions  
5 impliquées dans la reconnaissance et la liaison du récepteur cellulaire naturel des  
adénovirus. Elle concerne également les adénovirus recombinants portant à leur surface  
une telle fibre et un ligand qui leur confère une spécificité d'hôte modifiée ou ciblée  
envers un type cellulaire particulier, les cellules contenant ces adénovirus ainsi qu'une  
10 méthode pour préparer des particules virales infectieuses de ces derniers destinées à un  
usage thérapeutique. L'invention présente un intérêt tout particulier pour des  
perspectives de thérapie génique, notamment chez l'homme.

Grâce à leurs propriétés particulières, les adénovirus sont employés dans un  
nombre croissant d'applications en thérapie génique. Mis en évidence dans de  
nombreuses espèces animales, ils sont peu pathogènes, non-intégratifs et se répliquent  
15 aussi bien dans les cellules en division que quiescentes. De plus, ils présentent un large  
spectre d'hôte et sont capables d'infecter un très grand nombre de types cellulaires tels  
que les cellules épithéliales, endothéliales, les myocytes, les hépatocytes, les cellules  
nerveuses et les synoviocytes (Bramson et al., 1995, Curr. Op. Biotech. 6, 590-595).  
Cependant, cette absence de spécificité d'infection pourrait constituer une limite à  
20 l'utilisation des adénovirus recombinants, d'une part, au niveau de la sécurité puisqu'il  
peut y avoir dissémination du gène recombinant dans l'organisme hôte et, d'autre part,  
au niveau de l'efficacité puisque le virus n'infecte pas spécifiquement le type cellulaire  
que l'on souhaite traiter.

D'une manière générale, le génome adénoviral est constitué d'une molécule  
25 d'ADN linéaire, bicaténaire et d'environ 36kb contenant les gènes codant pour les  
protéines virales et à ses extrémités deux répétitions inversées (désignées ITR pour  
Inverted Terminal Repeat) intervenant dans la réplication et la région d'encapsidation.  
Les gènes précoces sont répartis en 4 régions dispersées dans le génome adénoviral (E1

à E4 ; E pour early en anglais), comportant 6 unités transcriptionnelles munies de leurs propres promoteurs. Les gènes tardifs (L1 à L5 ; L pour late en anglais) recouvrent en partie les unités de transcription précoces et sont, pour la plupart, transcrits à partir du promoteur majeur tardif MLP (pour Major Late Promoter en anglais).

5           A titre indicatif, tous les adénovirus utilisés dans les protocoles de thérapie génique sont déficients pour la réplication par délétion d'au moins la région E1 et sont propagés dans une lignée cellulaire de complémentation, qui fournit *en trans* les fonctions virales délétées. On utilise couramment la lignée 293, établie à partir de cellules de rein embryonnaire humain, qui complémente efficacement la fonction E1  
10 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72). Des vecteurs de seconde génération ont récemment été proposés dans la littérature. Ils conservent les régions *en cis* nécessaires à la réplication du virus dans la cellule infectée (ITRs et séquences d'encapsidation) et comportent des délétions internes importantes visant à supprimer l'essentiel des gènes viraux dont l'expression *in vivo* peut conduire à l'établissement de réponses  
15 inflammatoires ou immunitaires chez l'hôte. Les vecteurs adénoviraux et leur technique de préparation ont fait l'objet de nombreuses publications accessibles à l'homme du métier.

Le cycle infectieux des adénovirus se déroule en 2 étapes. La phase précoce précède l'initiation de la réplication et permet de produire les protéines précoces  
20 régulant la réplication et la transcription de l'ADN viral. La réplication du génome est suivie de la phase tardive au cours de laquelle sont synthétisées les protéines structurales qui constituent les particules virales. L'assemblage des nouveaux virions prend place dans le noyau. Dans un premier temps, les protéines virales s'assemblent de manière à former des capsides vides de structure icosaédrique dans lesquelles le génome  
25 est encapsidé. Les adénovirus libérés sont susceptibles d'infecter d'autres cellules permissives. A cet égard, la fibre et le penton base présents à la surface des capsides jouent un rôle critique dans l'attachement cellulaire des virions et leur internalisation.

L'adénovirus se lie à un récepteur cellulaire présent à la surface des cellules

permissives par l'intermédiaire de la fibre trimérique (Philipson et al., 1968, *J. Virol.* 2, 1064-1075 ; Defer et al., 1990, *J. Virol.* 64, 3661-3673). La particule est ensuite internalisée par endocytose par la liaison du penton base aux intégrines cellulaires  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_v\beta_5$  (Mathias et al., 1994, *J. Virol.* 68, 6811-6814). La capacité de la fibre soluble  
5 ou d'anticorps anti-fibre à inhiber l'infection démontre son rôle dans l'attachement cellulaire du virus.

La fibre est composée de 3 domaines (Chroboczek et al., 1995, *Current Top. Microbiol. Immunol.* 199, 165-200) :

- (1) En N-terminal, la queue très conservée d'un sérotype à l'autre, interagit avec le  
10 penton base et assure l'ancrage de la molécule dans la capside.
- (2) La tige est une structure en bâtonnet composée d'un certain nombre de répétitions de feuillets  $\beta$ , ce nombre variant selon les sérotypes.
- (3) Enfin, à l'extrémité distale de la tige, la tête est une structure globulaire  
15 sphérique qui contient les signaux de trimérisation (Hong et Engler, 1996, *J. Virol.* 70, 7071-7078 ; Novelli et Boulanger, 1991, *J. Biol. Chem.* 266, 9299-9303 ; Novelli et Boulanger, 1991, *Virology* 185, 365-376). De plus, la plupart des données expérimentales montrent que le domaine de la tête est responsable de la liaison aux cellules permissives (Henry et al., 1994, *J. Virol.* 68, 5239-5246 ; Louis et al., 1994, *J. Virol.* 68, 4104-4106).

20 Des adénovirus "ciblés" dont la fibre native est modifiée de manière à reconnaître un récepteur cellulaire différent ont déjà été proposés dans la littérature. Ainsi, WO94/10323 décrit des mutants de la fibre d'Ad5 dans lesquels une séquence codant pour un fragment d'anticorps (de type scFv) est insérée à la fin de l'une des 22 unités répétitives de la tige dans le but de modifier la spécificité d'infection à l'égard des  
25 cellules présentant l'antigène cible. US 5,543,328 décrit une fibre chimère Ad5 dans laquelle le domaine de la tête est remplacé par le facteur de nécrose des tumeurs (TNF) de manière à interagir avec le récepteur cellulaire du TNF. Dans une autre construction, la fibre native d'Ad5 est fusionnée à son extrémité C-terminale au peptide ApoE

permettant une liaison au récepteur LDL (pour low density lipoprotein en anglais) présent à la surface des cellules hépatiques. WO95/26412 décrit une fibre modifiée par incorporation d'un ligand à l'extrémité C-terminale qui conserve ses capacités de trimérisation. WO96/26281 décrit une fibre chimère obtenue par remplacement d'une  
5 partie de la fibre native et, en particulier de la tête, par la partie équivalente d'une fibre adénovirale d'un autre sérotype et, éventuellement, par insertion à l'extrémité C-terminale d'un peptide RGD spécifique de la vitronectine.

Comme précédemment indiqué, la spécificité d'infection d'un adénovirus est déterminée par l'attachement de la fibre adénovirale à un récepteur cellulaire situé à la  
10 surface des cellules permissives. La demande de brevet français 97 01005 a mis en évidence le rôle des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et des modules III de la fibronectine à titre respectivement de récepteur primaire et de co-facteur des adénovirus. Mais d'autres protéines peuvent intervenir. A cet égard, des travaux récents ont présumé l'utilisation du récepteur cellulaire des coxsachie virus par  
15 les adénovirus de types 2 et 5 pour pénétrer dans leurs cellules cibles (Bergelson et al., 1997, Science 275, 1320-1323). Le problème que la présente invention se propose de résoudre est de modifier la région d'interaction de la fibre adénovirale avec le(s) récepteur(s) cellulaire(s) afin d'altérer la spécificité d'hôte naturelle des adénovirus portant la fibre mutée. Pour faciliter la compréhension, on utilisera ci-après le terme  
20 «récepteur cellulaire» des adénovirus pour désigner le ou les polypeptides cellulaires intervenant directement ou non dans la liaison des adénovirus à leurs cellules cibles naturelles ou dans la pénétration au sein de ces dernières. Bien entendu, ledit récepteur peut être différent selon les sérotypes. L'addition d'un ligand permet de conférer un nouveau tropisme envers un ou plusieurs types cellulaires spécifiques portant à leur  
25 surface une molécule cible reconnue par le ligand en question.

La présente invention constitue une amélioration de la technique antérieure puisqu'elle divulgue les régions de la fibre à muter pour inhiber ou empêcher la liaison au récepteur cellulaire naturel des adénovirus. On a maintenant substitué ou délété un

- 5 -

ou plusieurs résidus de la région 443 à 462 de la tête de la fibre d'Ad5 et montré une inhibition de l'infectivité des adénovirus correspondants à l'égard des cellules normalement permissives. L'introduction du ligand GRP (pour gastrin releasing peptide en anglais) au sein de ces fibres devrait permettre de cibler l'infection vers les cellules exprimant le récepteur au GRP. Le but de la présente invention est de diminuer les quantités thérapeutiques d'adénovirus à utiliser et de cibler l'infection au niveau des cellules à traiter. Cette spécificité est indispensable lorsque l'on met en oeuvre un adénovirus exprimant un gène cytotoxique pour éviter la propagation de l'effet cytotoxique aux cellules saines. Les avantages procurés par la présente invention sont de réduire les risques de dissémination et les effets secondaires liés à la technologie adénovirale.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet une fibre d'un adénovirus modifiée par mutation d'un ou plusieurs résidus de ladite fibre, caractérisée en ce que lesdits résidus sont dirigés vers le récepteur cellulaire naturel dudit adénovirus.

Le terme "fibre" est largement défini dans la partie introductive. La fibre de la présente invention peut dériver d'un adénovirus d'origine humaine, canine, aviaire, bovine, murine, ovine, porcine ou simienne ou encore être hybride et comprendre des fragments d'origines diverses. Concernant les adénovirus humains, on préfère utiliser ceux de sérotype C et, notamment, les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad2 ou Ad5). On indique que la fibre d'Ad2 comporte 580 acides aminés (aa) dont la séquence est divulguée dans Herissé et al. (1981, Nucleic Acid Res. 9, 4023-4042). Celle d'Ad5 présente 582 aa et sa séquence présentée à l'identificateur de séquence 1 (SEQ ID NO: 1) a été déterminée par Chroboczek et Jacrot (1987, Virology 161, 549-554). Lorsque la fibre de la présente invention est originaire d'un adénovirus animal, on a de préférence recours aux adénovirus bovins et, en particulier, ceux de la souche BAV-3. Ces derniers ont fait l'objet de nombreuses études et la séquence de la fibre est divulguée dans la demande internationale WO95/16048. Bien entendu, la fibre de la présente invention peut présenter d'autres modifications par rapport à la séquence native, outre celles qui

font l'objet de la présente invention.

Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, la fibre selon l'invention est modifiée de manière à réduire ou abolir sa capacité de liaison au récepteur cellulaire naturel. Une telle propriété peut être vérifiée par l'étude de l'infectivité ou de la liaison cellulaire des virus correspondants en appliquant les techniques de l'art telles que celles détaillées ci-après. Selon un mode de réalisation avantageux, les propriétés de trimérisation et de liaison au penton-base ne sont pas affectées.

Au sens de la présente invention, le terme "mutation" désigne une délétion, une substitution ou encore une addition d'un ou plusieurs résidus ou une combinaison de ces possibilités. On préfère tout particulièrement le cas où les régions d'interaction avec le récepteur cellulaire naturel sont délétées en totalité ou en partie et remplacées notamment par un ligand spécifique d'une protéine de surface cellulaire autre que le récepteur naturel des adénovirus.

La structure cristallographique tridimensionnelle de la tête adénovirale a été déterminée par Xia et al. (1994, Structure 2, 1259-1270). Chaque monomère comporte 8 feuillets  $\beta$  antiparallèles désignés A à D et G à J et 6 boucles majeures de 8 à 55 résidus. Par exemple, la boucle CD relie le feuillet  $\beta$  C au feuillet  $\beta$  D. On indique que les feuillets mineurs E et F sont considérés comme faisant partie de la boucle DG située entre les feuillets D et G. A titre indicatif, le tableau 1 indique la localisation de ces structures dans la séquence en acides aminés de la fibre d'Ad5 telle que montrée à l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO: 1), le +1 représentant le résidu Met initiateur. D'une manière générale, les feuillets forment une structure ordonnée et compacte alors que les boucles sont plus flexibles. Ces termes sont classiques dans le domaine de la biochimie des protéines et sont définis dans les ouvrages de base (voir par exemple Stryer, Biochemistry, 2ème édition, Chap 2, p 11 à 39, Ed Freeman et Compagny, San Francisco).

Tableau 1

feuille $\beta$		boucle	
nomenclature	résidus	nomenclature	résidus
A	400 à 403	AB	404 à 418
B	419 à 428	-	-
C	431 à 440	CD	441 à 453
D	454 à 461	DG	462 à 514
G	515 à 521	GH	522 à 528
H	529 à 536	HI	537 à 549
I	550 à 557	IJ	558 à 572
J	573 à 578		

Les quatre feuillets  $\beta$  A, B, C et J constituent les feuillets V dirigés vers la  
5 particule virale. Les quatre autres (D, G, H et I) forment les feuillets R, supposés faire  
face au récepteur cellulaire. Les feuillets V semblent jouer un rôle important dans la  
trimérisation de la structure alors que les feuillets R seraient impliqués dans l'interaction  
avec le récepteur. Les résidus de la fibre d'Ad2, Ad3, Ad5, Ad7, Ad40, Ad41 et de  
l'adénovirus canin CAV formant ces différentes structures sont clairement indiqués dans  
10 la référence précédente.

Les modifications de la fibre adénovirale selon l'invention touchent plus  
particulièrement le domaine s'étendant de la boucle CD au feuillet I et concernant  
notamment les résidus 441 à 557 de la fibre Ad5 et 441 à 558 de la fibre d'Ad2. Du fait

de leur localisation spatiale dans la fibre native, ces résidus sont susceptibles de reconnaître et/ou interagir directement ou indirectement avec le récepteur cellulaire naturel de l'adénovirus concerné. Au sein de cette région, on préfère modifier la partie qui comprend la boucle CD, le feuillet D et la partie proximale de la boucle DG  
5 (positions 441 à 478 de la fibre d'Ad2 et d'Ad5) et, plus particulièrement, la région s'étendant des résidus 443 à 462 pour ce qui est de l'Ad5 ou 451 à 466 dans le cas de l'Ad2. L'autre région cible pour les modifications est le feuillet H (aa 529 à 536 de l'Ad5 fibre et de la fibre d'Ad2). Une autre alternative consiste en la modification des  
feuillet mineurs E (aa 479-482 Ad5) et F (aa 485-486 Ad5).

10 Comme indiqué précédemment, on peut opérer par substitution d'un ou plusieurs acides aminés dans les régions exposées. On peut citer à ce titre les exemples suivants qui dérivent de la fibre d'Ad5 dans laquelle :

- le résidu glycine en position 443 est substitué par un acide aspartique,
- le résidu leucine en position 445 est substitué par une phénylalanine,
- 15 - le résidu glycine en position 450 est substitué par une asparagine,
- le résidu thréonine en position 451 est substitué par une lysine,
- le résidu valine en position 452 est substitué par une asparagine,
- le résidu alanine en position 455 est substitué par une phénylalanine,
- le résidu leucine en position 457 est substitué par une alanine ou une lysine,
- 20 et/ou
- le résidu isoleucine en position 459 est substitué par une alanine.

Il est également possible d'introduire plusieurs substitutions au sein de la région ciblée de la fibre notamment au niveau des acides aminés formant un coude, de préférence de type  $\alpha\alpha$  (voir le Tableau 2 de Xia et al., 1994, *supra*). Pour illustrer, on  
25 peut citer les deux exemples suivants dans lesquels la fibre d'Ad5 est modifiée par substitution :

- du résidu glycine en position 443 par un acide aspartique,
- du résidu sérine en position 444 par une lysine, et

- 9 -

- du résidu alanine en position 446 par une thréonine.

ou encore

- du résidu sérine en position 449 par un acide aspartique,

- du résidu glycine en position 450 par une lysine,

5 - du résidu thréonine en position 451 par une leucine, et

- du résidu valine en position 452 par une thréonine.

Bien entendu, les acides aminés de remplacement ne sont mentionnés qu'à titre indicatif et tout acide aminé peut convenir aux fins de la présente invention. On préfère cependant ne pas modifier de façon drastique la structure tridimensionnelle. De  
10 préférence, les acides aminés formant un coude seront remplacés par des résidus formant une structure similaire tels que ceux cités dans la référence Xia et al. déjà mentionnée.

La fibre de la présente invention peut également être modifiée par délétion. La région éliminée peut concerner tout ou partie du domaine exposé et, notamment de la  
15 boucle CD, du feuillet D, de la boucle DG et/ou des feuillets E et F. Concernant une fibre d'Ad5 selon l'invention, on peut citer plus particulièrement la délétion :

- de la région s'étendant de la sérine en position 454 à la phénylalanine en position 461,

20 - de la région s'étendant de la valine en position 441 à la glutamine en position 453,

- de la région s'étendant de la valine en position 441 à la phénylalanine en position 461, ou

- de la région s'étendant de l'asparagine en position 479 à la thréonine en position 486.

25 Il est également possible de générer d'autres mutants de substitution ou de délétion dans les autres feuillets ou boucles, comme par exemple les feuillets G, H et I et les boucles HI et DG.

Selon un mode de réalisation avantageux, lorsque l'une au moins des

- 10 -

modifications est une délétion d'au moins 3 résidus consécutifs d'une boucle et/ou d'un feuillet, les résidus délétés peuvent être remplacés par des résidus d'une boucle et/ ou d'un feuillet équivalent dérivé d'une fibre d'un second adénovirus susceptible d'interagir avec un récepteur cellulaire différent de celui reconnu par le premier adénovirus. Le

5 second adénovirus peut être d'une origine quelconque humaine ou animale. Ceci permet de maintenir la structure de la fibre selon l'invention tout en lui conférant une spécificité d'hôte correspondant à celle du second adénovirus. Comme indiqué dans Xia et al. (1994, *supra*), le récepteur cellulaire médiant l'infection des adénovirus de types 2 et 5 est différent de celui interagissant avec les adénovirus de types 3 et 7. Ainsi, une fibre

10 d'Ad5 ou d'Ad2 délétée d'au moins 3 résidus consécutifs parmi ceux spécifiés ci-dessus peut-être substituée par les résidus issus d'une région équivalente de la fibre d'Ad3 ou d'Ad7 pour réduire sa capacité à lier le récepteur d'Ad5 et lui conférer une nouvelle spécificité envers le récepteur cellulaire d'Ad3 ou d'Ad7. A titre d'exemple non limitatif, on peut citer le remplacement des résidus LAPISGTVQSAHLIRFD (positions 445 à

15 462) de la fibre d'Ad5 par les résidus VNTLFKNKNVSINVELYFD de la fibre d'Ad3 ou le remplacement des résidus PVTLTITL (position 529 à 536) de la fibre de l'Ad5 par les résidus PLEVTVML de la fibre de l'Ad3.

La présente invention concerne également une fibre d'un adénovirus présentant une capacité de liaison au récepteur cellulaire naturel substantiellement réduite et

20 néanmoins capable de trimériser et de lier le penton base. Comme indiqué ci-avant, le récepteur cellulaire naturel est avantageusement choisi parmi le groupe constitué par les antigènes majeurs d'histocompatibilité de classe I, la fibronectine et le récepteur cellulaire des coxsachie virus (CAR) ou tout autre déterminant de surface cellulaire intervenant habituellement ou participant à l'infectivité des adénovirus.

25 Selon un mode de réalisation également avantageux, la fibre selon l'invention comprend en outre un ligand. Au sens de la présente invention, le terme ligand définit toute entité capable de reconnaître et lier, de préférence avec une forte affinité, une molécule de surface cellulaire différente du récepteur cellulaire naturel. Cette molécule

peut être exprimée ou exposée à la surface de la cellule que l'on désire cibler (marqueur de surface cellulaire, récepteur, peptide antigénique présenté par les antigènes d'histocompatibilité...). Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, un ligand peut être un anticorps, un peptide, une hormone, un polypeptide ou encore  
5 un sucre. Le terme anticorps comprend notamment les anticorps monoclonaux, les fragments d'anticorps (Fab) et les anticorps simple chaîne (scFv). Ces dénominations et abréviations sont conventionnelles dans le domaine de l'immunologie.

Dans le cadre de la présente invention, il peut être intéressant de cibler plus particulièrement une cellule tumorale, une cellule infectée, un type cellulaire particulier  
10 ou une catégorie de cellules portant un marqueur de surface spécifique. Par exemple, si la cellule hôte à cibler est une cellule infectée par le virus HIV (Human Immunodeficiency Virus), le ligand peut être un fragment d'anticorps contre la fusine, le récepteur CD4 ou contre une protéine virale exposée (glycoprotéine d'enveloppe) ou encore la partie de la protéine TAT du virus HIV s'étendant des résidus 37 à 72 ;  
15 (Fawell et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 664-668). S'agissant d'une cellule tumorale, le choix se portera sur un ligand reconnaissant un antigène spécifique de tumeur (par exemple la protéine MUC-1 dans le cas du cancer du sein, certains épitopes des protéines E6 ou E7 du papilloma virus HPV) ou surexprimé (récepteur à l'IL-2 surexprimé dans certaines tumeurs lymphoïdes, peptide GRP pour Gastrin Releasing  
20 Peptide surexprimé dans les cellules de carcinome du poumon (Michaël et al., 1995 Gene Therapy 2, 660-668) et dans les tumeurs du pancréas de la prostate et de l'estomac). Si l'on désire cibler les lymphocytes T, on peut employer un ligand du récepteur de cellule T. Par ailleurs, la transferrine est un bon candidat pour un ciblage hépatique. D'une manière générale, les ligands qui peuvent être utilisés dans le contexte  
25 de l'invention sont largement décrits dans la littérature et peuvent être clonés par les techniques standards. Il est également possible de les synthétiser par voie chimique et les coupler à la fibre selon l'invention. A cet égard, le couplage de résidus galactosyl devrait conférer une spécificité hépatique en raison de l'interaction avec les récepteurs

- 12 -

aux asialoglycoprotéines. Mais le mode de réalisation préféré consiste à insérer le ligand à l'extrémité C-terminale de la fibre selon l'invention ou en remplacement des résidus délétés lorsque l'une au moins des modifications est une délétion d'au moins 3 résidus consécutifs.

5           La présente invention a également trait à un fragment d'ADN codant pour une fibre selon l'invention ainsi qu'à un vecteur d'expression d'un tel fragment. Tout type de vecteur peut être employé à cet effet, qu'il soit d'origine plasmidique ou virale, intégratif ou non. De tels vecteurs sont disponibles commercialement ou décrits dans la littérature. De même, l'homme du métier est capable d'adapter les éléments de  
10 régulation nécessaires à l'expression du fragment d'ADN selon l'invention. En outre, il peut être associé à une ou plusieurs substances susceptibles d'améliorer l'efficacité transfectionnelle et/ou la stabilité du vecteur. Ces substances sont largement documentées dans la littérature accessible à l'homme de l'art (voir par exemple Felgner et al., 1989, Proc. West. Pharmacol. Soc. 32, 115-121 ; Hodgson et Solaiman, 1996,  
15 Nature Biotechnology 14, 339-342 ; Remy et al., 1994, Bioconjugate chemistry 5, 647-654). A titre illustratif et non limitatif, il peut s'agir de polymères, de lipides notamment cationiques, de liposomes, de protéines nucléaires et de lipides neutres. Une combinaison envisageable est un vecteur associé à des lipides cationiques (DC-Chol, DOGS ...etc) et des lipides neutres (DOPE).

20           La présente invention concerne également un adénovirus dépourvu d'une fibre native fonctionnelle et qui comprend à sa surface une fibre selon l'invention. Celle-ci peut être exprimée par le génome adénoviral ou apportée *en trans* par une lignée cellulaire de complémentation, telle que celles définies ci-après. Il peut en outre comprendre un ligand tel que défini ci-dessus. De préférence, la spécificité de liaison  
25 d'un tel adénovirus à son récepteur cellulaire naturel est réduite de manière significative ou mieux abolie, du fait de la fibre modifiée qu'il porte. La perte de la spécificité naturelle peut être évaluée par des études d'attachement cellulaire réalisées en présence de virus marqués (par exemple à la <sup>3</sup>H thymidine selon la technique de Roelvink et al.,

1996, J. Virol. 70, 7614-7621) ou par des études d'infectivité de cellules permissives ou exprimant la molécule de surface ciblée par le ligand (voir les exemples qui suivent).

Le ligand peut être couplé de manière chimique à l'adénovirus selon l'invention. Mais, on préfère la variante selon laquelle les séquences codant pour le ligand sont  
5 insérées au sein du génome adénoviral, en particulier, au sein des séquences codant pour la fibre modifiée selon l'invention, de préférence, en phase afin de préserver le cadre de lecture. L'insertion peut avoir lieu à un endroit quelconque. Néanmoins, le site d'insertion préféré est en amont du codon stop à l'extrémité C-terminale ou à la place des résidus délétés. Il est également envisageable d'introduire les séquences du ligand  
10 au sein d'autres séquences adénovirales, notamment celles codant pour une autre protéine de capside, comme l'hexon ou le penton.

Avantageusement, un adénovirus selon l'invention est recombinant et défectif pour la réplication, c'est à dire incapable de réplication autonome dans une cellule hôte. La déficience est obtenue par mutation ou délétion d'un ou plusieurs gènes viraux  
15 essentiels et, notamment, de tout ou partie de la région E1. Des délétions au sein de la région E3 peuvent être envisagées pour accroître les capacités de clonage. Cependant, il peut être avantageux de conserver les séquences codant pour la protéine gp19k (Gooding et Wood, 1990, Critical Reviews of Immunology 10, 53-71) afin de moduler les réponses immunitaires de l'hôte. Bien entendu, le génome d'un adénovirus selon  
20 l'invention peut également comprendre des délétions ou mutations supplémentaires affectant d'autres régions, notamment les régions E2, E4 et/ou L1-L5 (voir par exemple la demande internationale WO94/28152 et Ensinger et al., 1972, J. Virol. 10, 328-339 décrivant la mutation thermosensible du gène DBP de E2).

Selon un mode de réalisation préféré, un adénovirus selon l'invention est  
25 recombinant et comprend un ou plusieurs gène(s) d'intérêt placé(s) sous le contrôle des éléments nécessaires à son (leur) expression dans une cellule hôte. Le gène en question peut être d'une origine quelconque, génomique, ADNc (ADN complémentaire) ou hybride (minigène dépourvu d'un ou plusieurs introns). Il peut être obtenu par les

techniques conventionnelles de biologie moléculaire ou par synthèse chimique. Il peut coder pour un ARN anti-sens, un ribozyme ou un ARNm qui sera ensuite traduit en polypeptide d'intérêt. Celui-ci peut être cytoplasmique, membranaire ou être sécrété de la cellule hôte. Par ailleurs, il peut s'agir de tout ou partie d'un polypeptide tel que

5 trouvé dans la nature, d'un polypeptide chimère provenant de la fusion de séquences d'origines diverses, ou d'un polypeptide muté par rapport à la séquence native présentant des propriétés biologiques améliorées et/ou modifiées.

Dans le cadre de la présente invention, il peut être avantageux d'utiliser les gènes codant pour les polypeptides suivants :

- 10 - cytokines ou lymphokines (interférons  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , interleukines et notamment l'IL-2, l'IL-6, l'IL-10 ou l'IL-12, facteurs nécrosant des tumeurs (TNF), facteurs stimulateurs de colonies (GM-CSF, C-CSF, M-CSF...);
- récepteurs cellulaires ou nucléaires, notamment ceux reconnus par des organismes pathogènes (virus, bactéries, ou parasites) et, de préférence, par le
- 15 virus VIH ou leurs ligands (fas ligand);
- protéines impliquées dans une maladie génétique (facteur VII, facteur VIII, facteur IX, dystrophine ou minidystrophine, insuline, protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), hormones de croissance (hGH);
- 20 - enzymes (uréase, rénine, thrombine....);
- inhibiteurs d'enzymes ( $\alpha$ 1-antitrypsine, antithrombine III, inhibiteurs de protéases virales...);
- polypeptides à effet anti-tumoral capables d'inhiber au moins partiellement l'initiation ou la progression de tumeurs ou cancers (anticorps, inhibiteurs
- 25 agissant au niveau de la division cellulaire ou des signaux de transduction, produits d'expression des gènes suppresseurs de tumeurs, par exemple p53 ou Rb, protéines stimulant le système immunitaire....);
- protéines du complexe majeur d'histocompatibilité des classes I ou II ou

- protéines régulatrices agissant sur l'expression des gènes correspondants ;
- polypeptides capables d'inhiber une infection virale, bactérienne ou parasitaire ou son développement (polypeptides antigéniques ayant des propriétés immunogènes, épitopes antigéniques, anticorps, variants trans-dominants susceptibles d'inhiber l'action d'une protéine native par compétition...);
  - toxines (thymidine kinase de virus simplex de l'herpès 1 (TK-HSV-1), ricine, toxine cholérique, diphtérique.....) ou immunotoxines
  - marqueurs ( $\beta$ -galactosidase, luciférase....),
  - polypeptide ayant un effet sur l'apoptose (inducteur d'apoptose : Bax.... inhibiteur d'apoptose Bcl2, Bclx), agents cytostatiques (p21, p16, Rb...), les apolipoprotéines (apoE....), SOD, catalase, oxyde nitrique synthase (NOS) ; et
  - facteurs de croissance (FGF pour Fibroblast growth Factor, VEGF pour Vascular Endothelial cell growth Factor....).

Il est à signaler que cette liste n'est pas limitative et que d'autres gènes peuvent également être employés.

Par ailleurs, un adénovirus selon l'invention peut, en outre, comprendre un gène de sélection permettant de sélectionner ou identifier les cellules infectées. On peut citer les gènes *neo* (codant pour la néomycine phosphotransférase) conférant une résistance à l'antibiotique G418, *dhfr* (Dihydrofolate Réductase), CAT (Chloramphenicol Acetyl transférase), *pac* (Puromycine Acétyl-Transferase) ou encore *gpt* (Xanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase). D'une manière générale, les gènes de sélection sont connus de l'homme de l'art.

Par éléments nécessaires à l'expression d'un gène d'intérêt dans une cellule hôte, on entend l'ensemble des éléments permettant sa transcription en ARN et la traduction d'un ARNm en protéine. Parmi ceux-ci, le promoteur revêt une importance particulière. Dans le cadre de la présente invention, il peut dériver d'un gène quelconque d'origine eucaryote ou même virale et peut être constitutif ou régulable. Par ailleurs, il peut être modifié de manière à améliorer l'activité promotrice, supprimer une région inhibitrice

- 16 -

de la transcription, rendre un promoteur constitutif régulable ou vice versa, introduire un site de restriction..... Alternativement, il peut s'agir du promoteur naturel du gène à exprimer. On peut mentionner, à titre d'exemples, les promoteurs viraux CMV (Cytomegalovirus), RSV (Rous Sarcoma Virus), du gène TK du virus HSV-1, précoce  
5 du virus SV40 (Simian Virus 40), adénoviral MLP ou encore les promoteurs eucaryotes des gènes PGK (Phospho Glycerate kinase) murin ou humain, MT (métallothionéine),  $\alpha$ 1-antitrypsine et albumine (foie-spécifique), immunoglobulines (lymphocyte-spécifique). On peut également employer un promoteur spécifique de tumeur ( $\alpha$  fétoprotéine AFP, Ido et al., 1995, Cancer Res. 55, 3105-3109 ; MUC-1 ; PSA pour  
10 prostate specific antigen, Lee et al., 1996, J. Biol. Chem. 271, 4561-4568 ; et flt1 spécifique des cellules endothéliales, Morishita et al., 1995, J. Biol. Chem. 270, 27948-27953).

Bien entendu, un gène d'intérêt en usage dans la présente invention peut en outre comprendre des éléments additionnels nécessaires à l'expression (séquence  
15 intronique, séquence signal, séquence de localisation nucléaire, séquence terminatrice de la transcription, site d'initiation de la traduction de type IRES ou autre....) ou encore à sa maintenance dans la cellule hôte. De tels éléments sont connus de l'homme de l'art.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'un adénovirus selon l'invention, selon lequel :

- 20 - on transfecte le génome dudit adénovirus dans une lignée cellulaire appropriée,
- on cultive ladite lignée cellulaire transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production dudit adénovirus, et
- on récupère ledit adénovirus dans la culture de ladite lignée cellulaire transfectée et, éventuellement, on purifie substantiellement ledit adénovirus.

25 Le choix de la lignée cellulaire dépend des fonctions déficientes de l'adénovirus selon l'invention et on utilisera une lignée de complémentation capable de fournir *en trans* la ou les fonction(s) défectueuse(s). La lignée 293 convient pour compléter la fonction E1 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72). Pour une double

déficience E1 et E2 ou E4, on peut employer une lignée parmi celles décrites dans la demande de brevet français 96 04413. On peut également mettre en oeuvre un virus auxiliaire pour compléter l'adénovirus défectif selon l'invention dans une cellule hôte quelconque ou encore un système mixte utilisant cellule de complémentation et virus auxiliaire dans lequel les éléments sont dépendants les uns des autres. Les moyens de propagation d'un adénovirus défectif sont connus de l'homme de l'art qui peut se référer par exemple à Graham et Prevec (1991, Methods in Molecular Biology, vol 7, p 190-128 ; Ed E.J. Murey, The Human Press Inc.). Le génome adénoviral est de préférence reconstitué *in vitro* dans *Escherichia coli* (*E. coli*) par ligation ou encore recombinaison homologue (voir par exemple la demande française 94 14470). Les procédés de purification sont décrits dans l'état de la technique. On peut citer la technique de centrifugation sur gradient de densité.

La présente invention concerne également une lignée cellulaire comprenant soit sous forme intégrée dans le génome ou sous forme d'épisome un fragment d'ADN codant pour une fibre selon l'invention placé sous le contrôle des éléments permettant son expression. Ladite lignée peut en outre être capable de compléter un adénovirus déficient pour une ou plusieurs fonctions sélectionnées parmi celles codées par les régions E1, E2, E4 et L1-L5. Elle dérive de préférence de la lignée 293. Une telle lignée peut être utile à la préparation d'un adénovirus dont le génome est dépourvu de tout ou partie des séquences codant pour la fibre (de manière à produire une fibre non fonctionnelle). La présente invention a également pour objet le procédé correspondant, selon lequel :

- on transfecte le génome dudit adénovirus dans une lignée cellulaire selon l'invention,
- 25 - on cultive ladite lignée cellulaire transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production dudit adénovirus, et
- on récupère ledit adénovirus dans la culture de ladite lignée cellulaire transfectée et, éventuellement, on purifie substantiellement ledit adénovirus.

La présente invention couvre également une cellule hôte infectée par un adénovirus selon l'invention ou susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'invention. Il s'agit avantageusement d'une cellule de mammifère et, notamment, d'une cellule humaine. Elle peut être primaire ou tumorale et d'une origine quelconque, par exemple hématopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, lymphocyte, monocyte  
5 ou macrophage ...), musculaire (cellule satellite, myocyte, myoblaste, cellule musculaire lisse), cardiaque, nasale, pulmonaire, trachéale, hépatique, épithéliale ou fibroblaste.

L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique, une cellule hôte ou un  
10 adénovirus selon l'invention ou susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'invention, en association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. La composition selon l'invention est, en particulier, destinée au traitement préventif ou curatif de maladies telles que les maladies génétiques (hémophilie, mucoviscidose, diabète ou myopathie de Duchenne, de Becker...), les  
15 cancers, comme ceux induits par des oncogènes ou des virus, les maladies virales, comme l'hépatite B ou C et le SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquise résultant de l'infection par le VIH), les maladies virales récurrentes, comme les infections virales provoquées par le virus de l'herpès et les maladies cardiovasculaires dont les resténoses.

Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être fabriquée de  
20 manière conventionnelle. En particulier, on associe une quantité thérapeutiquement efficace de l'agent thérapeutique ou prophylactique à un support tel qu'un diluant. Une composition selon l'invention peut être administrée par voie locale, systémique ou par aérosol, en particulier par voie intragastrique, sous-cutanée, intracardiaque, intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale, intratumorale, intrapulmonaire,  
25 intranasale ou intratrachéale. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage appropriés varient en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu ou de la maladie à traiter ou encore du ou des gène(s) d'intérêt à transférer. En

particulier, les particules virales selon l'invention peuvent être formulées sous forme de doses comprises entre  $10^4$  et  $10^{14}$  ufp (unités formant des plages), avantageusement  $10^5$  et  $10^{13}$  ufp et, de préférence,  $10^6$  et  $10^{12}$  ufp. La formulation peut également inclure un diluant, un adjuvant, un excipient acceptable d'un point de vue pharmaceutique de même qu'un agent de stabilisation, de préservation et/ou de solubilisation. Une formulation en solution saline, non aqueuse ou isotonique convient particulièrement à une administration injectable. Elle peut être présentée sous forme liquide ou sèche (par exemple lyophilisat...) ou tout autre forme galénique couramment employée dans le domaine pharmaceutique.

Enfin, la présente invention est relative à l'usage thérapeutique ou prophylactique d'un adénovirus ou d'une cellule hôte selon l'invention ou d'un adénovirus susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'invention, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique. Selon une première possibilité, le médicament peut être administré directement *in vivo* (par exemple par injection intraveineuse, dans une tumeur accessible, dans les poumons par aérosol...). On peut également adopter l'approche *ex vivo* qui consiste à prélever des cellules du patient (cellules souches de la moëlle osseuse, lymphocytes du sang périphérique, cellules musculaires...), de les transfecter ou infecter *in vitro* selon les techniques de l'art et de les réadministrer au patient.

L'invention s'étend également à une méthode de traitement selon laquelle on administre une quantité thérapeutiquement efficace d'un adénovirus ou d'une cellule hôte selon l'invention à un patient ayant besoin d'un tel traitement.

## EXEMPLES

25

Les exemples suivants n'illustrent qu'un mode de réalisation de la présente invention.

Les constructions décrites ci-dessous sont réalisées selon les techniques générales

de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées dans Maniatis et al., (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. Les étapes de clonage mettant en oeuvre des plasmides bactériens sont réalisées de préférence dans la souche *E. coli* 5K (Hubacek et Glover, 1970, J. Mol. Biol. 50, 111-127) ou BJ 5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580). On utilise préférentiellement cette dernière souche pour les étapes de recombinaison homologue. La souche NM522 (Stratagène) convient à la propagation des vecteurs phagiques M13. Les techniques d'amplification par PCR sont connues de l'homme de l'art (voir par exemple PCR Protocols-A guide to methods and applications, 1990, édité par Innis, Gelfand, Sninsky et White, Academic Press Inc). S'agissant de la réparation des sites de restriction, la technique employée consiste en un remplissage des extrémités 5' protubérantes à l'aide du grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (Klenow). Les séquences nucléotidiques Ad5 sont celles utilisées dans la banque de donnée Genebank sous la référence M73260.

En ce qui concerne la biologie cellulaire, les cellules sont transfectées selon les techniques standards bien connues de l'homme du métier. On peut citer la technique au phosphate de calcium (Maniatis et al., *supra*), mais tout autre protocole peut également être employé, tel que la technique au DEAE dextran, l'électroporation, les méthodes basées sur les chocs osmotiques, la microinjection ou les méthodes basées sur l'emploi de lipides cationiques. Quant aux conditions de culture, elles sont classiques. Dans les exemples qui suivent, on a recours à la lignée humaine 293 (ATCC CRL1573) et aux lignées murines Swiss 3T3 (ATCC CCL92), NR6 (Wells et al., 1990, Science 247: 962-964), NR6-hEGFR (Schneider et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 333-336), Daudi HLA- (ATCC CCL213) et Daudi HLA+ (Quillet et al., 1988, J. Immunol. 141, 17-20). On indique que la lignée Daudi est établie à partir d'un lymphome de Burkitt et est naturellement déficiente en l'expression de la  $\beta$ -2 microglobuline et, de ce fait, ne possède pas à sa surface les molécules HLA de classe I (Daudi HLA-). La lignée

cellulaire E8.1 dérivée des Daudi a été générée par transfection d'un gène codant pour la  $\beta$ -2 microglobuline afin de restaurer l'expression de molécules HLA de classe I à leur surface (Daudi-HLA+ ; Quillet et al., 1988, J. Immunol. 141, 17-20). Il est entendu que d'autres lignées cellulaires peuvent également être utilisées.

5

EXEMPLE 1 :      Construction d'un adénovirus présentant un tropisme d'hôte envers les cellules exprimant le récepteur du GRP (pour gastrin releasing peptide en anglais).

10    *A. Insertion des séquences codant pour le ligand GRP (fibre-GRP).*

Le plasmide pTG6593 dérive du p poly II (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201) par introduction du gène complet codant pour la fibre d'Ad5 sous la forme d'un fragment *EcoRI-SmaI* (nucléotides (nt) 30049 à 33093). Le fragment *HindIII-SmaI* (nt  
15 31994-33093) est isolé et cloné dans M13TG130 (Kieny et al., 1983, Gene 26, 91-99) digéré par ces mêmes enzymes, pour donner M13TG6526. Ce dernier est soumis à une mutagenèse dirigée à l'aide de l'oligonucléotide oTG7000 (SEQ ID NO: 2) (kit Sculptor, in vitro mutagenesis, Amersham) afin d'introduire un adaptateur codant pour un bras espaceur de 12 acides aminés de séquence PSASASASAPGS. Le vecteur muté  
20 ainsi obtenu, M13TG6527, est soumis à une seconde mutagenèse permettant d'introduire la séquence codant pour les 10 résidus du peptide GRP (GNHWAVGHLM ; Michael et al., 1995, Gene Ther. 2, 660-668). On utilise à cet effet l'oligonucléotide oTG7001 (SEQ ID NO: 3). Le fragment *HindIII-SmaI* est isolé du phage muté M13TG6528 et introduit par la technique de recombinaison homologue (Chartier et al.,  
25 1996, J. Virol. 70, 4805-4810) dans le plasmide pTG6590 portant le fragment de génome adénoviral Ad5 s'étendant des nt 27081 à 35935 et linéarisé par *MunI* (nt 32825). Le fragment *SpeI-ScaI* (portant les nt 27082 à 35935 du génome Ad5 modifiés par introduction du bras espaceur et du peptide GRP) est isolé du vecteur précédent

- 22 -

désigné pTG8599 puis est échangé contre le fragment équivalent de pTG6591 préalablement digéré par ces mêmes enzymes. A titre indicatif, pTG6591 comprend les séquences adénovirales sauvages des positions 21562 à 35935. On obtient pTG4600 dont on isole le fragment *Bst*EII (nt 24843 à 35233). Après recombinaison homologue  
5 avec le plasmide pTG3602 qui comprend le génome Ad5 (décrit plus en détail dans la demande internationale WO96/17070), on génère le vecteur pTG4601.

Une cassette permettant l'expression du gène LacZ est introduite à la place de la région adénovirale E1 par recombinaison homologue entre le plasmide pTG4601 linéarisé par *Cla*I et un fragment *Bst*GI-*Pst*I comprenant le gène LacZ codant pour la  
10  $\beta$ -galactosidase sous le contrôle du promoteur MLP d'Ad2 et le signal de polyadénylation du virus SV40. Ce fragment est isolé du vecteur pTG8526 contenant l'extrémité 5' de l'ADN génomique viral (nt 1 à 6241) dans lequel la région E1 (nt 459 à 3328) est remplacée par la cassette d'expression LacZ. Sa construction est à la portée de l'homme du métier. Le vecteur final est désigné pTG4628.

15 Les virus correspondants AdTG4601 et AdTG4628 sont obtenus par transfection des fragments adénoviraux libérés des séquences plasmidiques par digestion *Pac*I dans la lignée 293. A titre indicatif, AdTG4601 porte le génome Ad5 complet dans lequel le gène de la fibre comprend en son extrémité 3' un bras espaceur suivi du peptide GRP. Le virus recombinant AdTG4628 porte en outre la cassette d'expression du gène  
20 rapporteur LacZ sous le contrôle du promoteur adénoviral MLP.

#### *B. Etude du tropisme du virus portant la fibre-GRP.*

La présence du peptide GRP au niveau de la fibre adénovirale permet de cibler les  
25 cellules exprimant à leur surface le récepteur au GRP. L'expression des messagers codant pour ce dernier est étudiée dans les cellules 293 et dans les cellules murines Swiss-3T3 (Zachary et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7616-7620) par Northern-blot. On utilise à titre de sonde un mélange de 2 fragments d'ADN

complémentaires à la séquence codant pour le récepteur au GRP marqués par les techniques conventionnelles à l'isotope  $^{32}\text{P}$ . A titre indicatif, les fragments sont produits par PCR réverse à partir des ARN cellulaires totaux à l'aide des oligonucléotides oTG10776 (SEQ ID NO: 4) et oTG10781 (SEQ ID NO: 5) (Battey et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 395-399 ; Corjay et al., 1991, J. Biol. Chem. 266, 18771-18779). L'intensité des ARNm détectés est beaucoup plus importante dans le cas des cellules Swiss-3T3 que dans les cellules 293, indiquant la surexpression du récepteur GRP par la lignée murine.

Des expériences de compétition sont réalisées sur les 2 types de cellules. Le compétiteur est constitué par la tête de la fibre d'Ad5 produite dans *E.coli* dont les propriétés de liaison au récepteur cellulaire adénoviral ont été montrées (Henry et al., 1994, J. Virol 68, 5239-5246). Les cellules en monocouche sont préalablement incubées pendant 30 min en présence de PBS ou de concentrations croissantes de tête Ad5 recombinante (0,1 à 100  $\mu\text{g/ml}$ ) dans du milieu DMEM (Gibco BRL) complété avec du sérum de veau foetal 2% (FCS). Puis, le virus AdTG4628 dont la fibre contient le peptide GRP est ajouté à une multiplicité d'infection de 0,001 unité infectieuse/cellule pour 24h à 37°C. On utilise à titre de contrôle et selon les mêmes conditions expérimentales, le virus recombinant AdLacZ (Stratford-Perricaudet et al., 1992, J. Clin. Invest. 90, 626-630) qui porte un gène de la fibre natif. Les cellules sont ensuite fixées et l'expression du gène LacZ évaluée (Sanes et al., 1986, EMBO J. 5, 3133-3142). Le nombre de cellules bleues est représentatif de l'efficacité de l'infection virale. Une inhibition par compétiton se traduit par une réduction du nombre de cellules colorées par rapport à un témoin sans compétiteur (PBS).

L'addition de tête Ad5 recombinante à une concentration de 100  $\mu\text{g/ml}$  inhibe fortement l'infection des cellules 293 par les virus AdLacZ et AdTG4628 (taux d'inhibition de 95 et 98%). Ceci suggère que la présence du compétiteur empêche l'interaction de la fibre adénovirale avec son récepteur cellulaire naturel. Par contre, les deux virus ont un comportement différent sur les cellules Swiss-3T3. L'infection du

- 24 -

virus AdTG4628 en présence de 100 µg/ml de compétiteur n'est que partiellement inhibée alors que, dans les mêmes conditions expérimentales, celle du virus AdLacZ ayant la fibre native est totalement inhibée. Ces résultats suggèrent que l'infection des cellules Swiss-3T3 par l'AdTG4628 est en partie médiée par un récepteur indépendant, 5 probablement le récepteur au GRP que ces cellules surexpriment. En conclusion, l'addition du ligand GRP à l'extrémité C-terminale de la fibre favorise l'infection des cellules exprimant le récepteur au GRP d'une manière indépendante de l'interaction fibre-récepteur cellulaire naturel.

10 EXEMPLE 2 :     Construction d'un adénovirus présentant un tropisme d'hôte envers les cellules exprimant le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor en anglais).

Cet exemple décrit une fibre portant les séquences EGF à son extrémité C-terminale. Pour cela, on met en oeuvre les oligonucléotides oTG11065 (SEQ ID NO: 6) et oTG11066 (SEQ ID NO: 7) pour amplifier un fragment *HindIII-XbaI* à partir du plasmide M13TG6527. Les oligonucléotides oTG11067 (SEQ ID NO: 8) et oTG11068 (SEQ ID NO: 9) permettent de générer un fragment *XhoI-SmaI* (allant du codon stop jusqu'au nt 33093) à partir de M13TG6527. L'ADN complémentaire de l'EGF, obtenu 20 de l'ATCC (#59957), est amplifié sous forme d'un fragment *XhoI-XbaI* à l'aide des oligonucléotides oTG 11069 (SEQ ID NO: 10) et oTG11070 (SEQ ID NO: 11). Les 3 fragments digérés par les enzymes adéquates sont ensuite reliés pour donner un fragment *HindIII-SmaI* contenant l'EGF fusionné à l'extrémité C-terminale de la fibre. On applique la même procédure de recombinaison homologue que celle décrite à 25 l'exemple 1 pour remplacer ce fragment dans son contexte génomique.

Cependant, on peut simplifier les étapes de clonage en introduisant un site unique *BsrBI* dans la région ciblée par les techniques classiques de mutagenèse. On obtient pTG4609 et pTG4213 avec LacZ. La recombinaison homologue entre pTG4609

- 25 -

linéarisé par *Bst*BI et le fragment *Hind*III-*Sma*I précédant génère le plasmide pTG4225 portant la région E1 sauvage. Son équivalent portant la cassette d'expression LacZ pTG4226 est obtenu par recombinaison homologue avec le pTG4213 digéré par *Bst*BI. Les virus AdTG4225 et AdTG4226 peuvent être produits classiquement par  
5 transfection d'une lignée cellulaire appropriée par exemple surexprimant le récepteur de l'EGF.

Pour tester la spécificité d'infection de ces virus, on peut utiliser les cellules fibroblastiques murines NR6 et les cellules NR6-hEGFR exprimant le récepteur de l'EGF humain. Des compétitions avec la tête d'Ad5 recombinante ou avec l'EGF  
10 permettent d'évaluer l'intervention des récepteurs cellulaires naturels et EGF pour médier l'infection des virus.

EXEMPLE 3 : Modifications de la tête de la fibre pour éliminer la liaison au récepteur cellulaire naturel.

15

La mutation de la région de la fibre adénovirale impliquée dans l'interaction avec le récepteur cellulaire naturel a été entreprise afin d'éliminer la capacité de la fibre à lier son récepteur naturel et l'addition d'un ligand permettra de modifier le tropisme des adénovirus correspondants.

20 Les séquences de la fibre Ad5 codant pour la région s'étendant des résidus 443 à 462 et 529 à 536 ont été soumises à diverses mutations. La délétion du feuillet D met en oeuvre l'oligonucléotide de mutagenèse oTG7414 (SEQ ID NO: 12) et la délétion de la boucle CD l'oligonucléotide oTGA (SEQ ID NO: 13). L'oligonucléotide oTGB (SEQ ID NO: 14) permet quant à lui la délétion de la boucle CD et du feuillet D.  
25 L'oligonucléotide OTG 7416 (SEQ ID NO: 38) permet la délétion du feuillet H. Tous ces oligonucléotides contiennent un site *Bam*HI permettant de détecter facilement les mutants et, également, d'insérer les séquences codant pour un ligand, par exemple le peptide EGF.

- 26 -

Une autre série de modifications consiste à remplacer ces régions délétées par les séquences équivalentes issues de la fibre d'Ad3 (D+CD5 en D+CD3 signifie que la région CD et D de la fibre Ad5 est remplacée par son équivalent d'Ad3). En effet, de nombreuses données montrent que l'Ad5 et l'Ad3 ne se lient pas au même récepteur, de sorte qu'une telle substitution devrait abolir l'infection médiée par le récepteur Ad5 et cibler les cellules portant le récepteur Ad3. Le remplacement de la boucle CD Ad5 par celle de l'Ad3 met en oeuvre oTG11135 (SEQ ID NO: 15), le remplacement du feuillet D de la fibre Ad5 par celui de la fibre Ad3 est effectué par l'oligonucléotide oTG10350 (SEQ ID NO: 16) et le remplacement du feuillet D et de la boucle CD de l'Ad5 par ceux de l'Ad3 est réalisé sur le mutant précédent à l'aide de oTG11136 (SEQ ID NO: 17). Le remplacement du feuillet H est réalisé à l'aide de l'oligonucléotide OTG 10352 (SEQ ID NO: 39).

On a également modifié cette région cible de la tête adénovirale par une série de mutations ponctuelles :

- 15 - remplacement du coude  $\alpha\alpha$  GSLA en coude  $\alpha\alpha$  DKLT: oTGC (SEQ ID NO: 18),
- remplacement du coude  $\alpha\alpha$  SGTV en coude  $\alpha\alpha$  DKLT : oTGD (SEQ ID NO: 19),
- G443 en D (G443D) : oTGE (SEQ ID NO: 20),
- 20 - L445 en F (L445F) : oTGF (SEQ ID NO: 21),
- G450 en N (G450N) : oTGG (SEQ ID NO: 22),
- T451 en K (T451K) : oTGH (SEQ ID NO: 23),
- V452 en N (V425N) : oTGI (SEQ ID NO: 24),
- A 455 en F (A455F) : oTGJ (SEQ ID NO: 25),
- 25 - L457 en K (L457K) : oTGK (SEQ ID NO: 26),
- I459 en A (I459A) : oTGL (SEQ ID NO: 27).

Les oTGE à I introduisent des mutations dans la boucle CD de la fibre

- 27 -

adénovirale sur des acides aminés qui sont non conservatifs entre l'Ad5 et l'Ad3 alors que les oTGJ à K concernent des acides aminés du feuillet D non engagés dans une liaison hydrogène stabilisant la structure.

Les mutagénèses peuvent être réalisées sur le vecteur M13TG6526 ou  
5 M13TG6528. Le premier porte le fragment *HindIII-SmaI* sauvage et le second ce même fragment modifié par l'insertion des séquences GRP. Les plasmides portant le génome adénoviral peuvent être reconstitués comme décrit auparavant pour les plasmides pTG4609 (E1 sauvage) et pTG4213 (LacZ à la place de la région E1). Les virus sont générés par transfection des cellules 293 ou bien de cellules surexprimant le  
10 récepteur liant le ligand concerné. De telles cellules peuvent être générées par transfection de l'ADN complémentaire correspondant. On utilise de préférence des cellules qui n'expriment pas naturellement le récepteur cellulaire naturel des adénovirus, par exemple la lignée Daudi (ATCC CCL213).

La viabilité des différents mutants est évaluée par transfection de cellules 293 et  
15 293-Fb+ (cellules 293 transfectées par un vecteur d'expression de la fibre d'Ad5 sauvage). Cependant, l'efficacité de transfection est variable d'une expérience à l'autre, même en ce qui concerne un adénovirus portant une fibre sauvage ayant incorporée le peptide GRP à son extrémité C-terminale (AdFbGRP). Pour standardiser les résultats, les plages obtenues après transfection des cellules 293-Fb+ sont tout d'abord amplifiées  
20 sur cette même lignée et les virus générés sont titrés : à ce stade ils peuvent porter soit la fibre sauvage soit la fibre mutante ou les 2 types. Les cellules 293 sont alors infectées avec ces virus à une faible multiplicité d'infection ne permettant d'infecter qu'environ 10% des cellules (MOI d'environ 0,2 unité infectieuse/cellule) et on détermine l'étendue de l'infection virale à 7 jours post-infection en mesurant l'accumulation de l'ADN viral  
25 et le titre viral. La propagation de l'infection étant dépendante de la fibre mutée, les mutants intéressants sont ceux qui ne donnent pas lieu à une infection productive, montrant que la mutation altère la liaison au récepteur naturel. La capacité de propagation des adénovirus portant la fibre mutée est comparée à celle d'un adénovirus

sauvage et d'un AdFbGRP.

Les résultats montrent que l'insertion du peptide GRP à l'extrémité de la fibre sauvage réduit légèrement la croissance du virus correspondant par rapport à un Ad sauvage, mais le facteur de multiplication est néanmoins de l'ordre de 1000. Les mutations V452N, D+CD5 en D+CD3 et L445F réduisent de manière significative (facteur 3 à 11) l'affinité de la tête de la fibre mutée pour le récepteur cellulaire naturel des adénovirus. Les mutations  $\Delta$ D (délétion du feuillet D de la fibre Ad5),  $\Delta$ CD+D (délétion de la boucle CD et du feuillet D), CD5 en CD3 (remplacement de la boucle CD d'un Ad5 par son équivalent d'un Ad3), G443D, A455F, L457K et I459A abolissent la propagation des virus correspondants dans les cellules 293 (facteur de multiplication inférieur à 1).

Puis on vérifie la capacité des virus mutants à pénétrer dans les cellules cibles par le biais du récepteur au GRP. Les mutants intéressants sont ceux qui présentent un facteur de multiplication significatif (supérieur à 1). A ce titre, on peut employer une lignée désignée 293-GRPR exprimant le MHC-I et le récepteur au GRP à des niveaux élevés. Elle est générée par transfection des cellules 293 par un plasmide d'expression eucaryotique portant l'ADNc du récepteur au GRP (Corjay et al., 1991, J. Biol. Chem. 266, 18771-18779). La cassette d'expression est constituée par le promoteur CMV précoce (Boshart et al., 1985, Cell 41, 521), les séquences d'épissage du gène  $\beta$ -globine, l'ADNc codant pour le récepteur au GRP et les séquences polyA du gène  $\beta$ -globine. La sélection des transformants est effectuée en présence d'hygromycine (350  $\mu$ g/ml) et 50 clones sont sélectionnés, amplifiés et testés pour l'expression de l'ARNm codant pour le récepteur par la technique de Northern. Les clones les plus producteurs sont rassemblés et désignés 293-GRPR. L'expression de la protéine peut également être contrôlée par FACS à l'aide d'un peptide GRP conjugué à la biotine et à l'avidine-FITC suivi d'une détection à l'aide de fluorosceine.

EXEMPLE 4 :     Insertion du ligand dans une protéine de capsid autre que la fibre

en association avec une des modifications de la fibre précitées.

Cet exemple décrit l'insertion du ligand EGF dans la protéine de capsid hexon. Bien entendu, il est préférable que l'adénovirus correspondant ait perdu sa capacité  
5 d'attachement au récepteur cellulaire naturel. Son génome peut par exemple inclure un gène de la fibre modifié (voir exemple 3) ou être dépourvu d'une partie au moins des séquences de la fibre.

On construit un plasmide de transfert pour la recombinaison homologue couvrant la région du génome d'Ad5 codant pour l'hexon (nt 18842-21700). Le fragment d'Ad5  
10 *HindIII-XhoI* (nt 18836-24816) est cloné dans pBSK+ (Stratagène) digéré par ces mêmes enzymes pour donner le plasmide pTG4224. Les séquences codant pour le peptide EGF sont introduites dans la boucle hypervariable L1 de l'hexon par création de fragments chimériques par PCR : hexon (nt19043-19647)-*XbaI*-EGF-*BsrGI*-hexon (nt19699-20312). Le fragment nt19043 à 19647 est obtenu par amplification PCR à  
15 partir du plasmide pTG3602 avec les oligonucléotides oTG11102 (SEQ ID NO: 28) et oTG11103 (SEQ ID NO: 29). Le fragment nt19699 à 20312 est amplifié à partir du même ADN avec les oligonucléotides oTG11104 (SEQ ID NO: 30) et oTG11105 (SEQ ID NO: 31). L'EGF est cloné à partir de l'ADNc à l'aide des oligonucléotides oTG11106 (SEQ ID NO: 32) et oTG11107 (SEQ ID NO: 33) permettant de mettre la  
20 séquence codante de l'EGF en phase avec l'hexon. Les produits PCR sont digérés par les enzymes adéquates puis reliqués. Le fragment chimérique peut alors être inséré par recombinaison homologue dans le plasmide pTG4224 linéarisé par *NdeI* (nt 19549), pour donner pTG4229. Les séquences codant pour l'hexon modifié peuvent être obtenues par digestion *HindIII-XhoI* et remplacées dans leur contexte génomique par  
25 recombinaison homologue. On peut utiliser le vecteur pTG3602, pTG4607, pTG4629 linéarisé par *SgfI* ou un vecteur portant le génome adénoviral délété des séquences de la fibre (comme pTG4607 décrit ci-dessous) ou exprimant une fibre modifiée conformément à l'exemple 3.

- 30 -

Le génome adénoviral incapable de produire une fibre native fonctionnelle est obtenu par une délétion touchant le codon initiateur mais ne s'étendant pas aux autres ORFs adénoviraux. On procède de la façon suivante: le fragment adénoviral en 5' de la délétion (nt 30564 à 31041) est amplifié par PCR à l'aide des amorces oTG7171 et oTG7275 (SEQ ID NO: 34 et 35). L'amplification du fragment en 3' (nt 31129 à 33099) met en oeuvre les amorces oTG7276 et oTG7049 (SEQ ID NO: 36 et 37). Les fragments PCR sont digérés par *XhoI* et mis en ligation avant d'être introduits par recombinaison homologue dans le vecteur pTG6591 linéarisé par *NdeI*, pour donner pTG4602. Puis le fragment *BstEII* isolé de ce dernier est soumis à une recombinaison homologue avec le vecteur pTG3602 digéré par *SpeI*. On obtient pTG4607. Le vecteur pTG4629 est équivalent à pTG4607, mais porte en outre la cassette d'expression *LacZ* à la place de E1.

Les virus correspondants peuvent être obtenus après transfection de cellules 293, 293-Fb+ ou de cellules surexprimant le récepteur de l'EGF. L'étude de la spécificité d'infection pourra être réalisée comme décrit auparavant en utilisant l'EGF en tant que compétiteur.

EXEMPLE 5 : Construction d'un mutant de la fibre délété des feuillets E et F.

On a également généré un mutant de délétion des feuillets EF du domaine de la tête de la fibre d'Ad5. Le plasmide pTG6593 est digéré par *HindIII* et *SmaI* et le fragment portant les séquences de la fibre est isolé et cloné dans le vecteur M13TG130 clivé par *HindIII* et *SmaI*. La mutation délétère met en oeuvre l'oligonucléotide indiqué dans la SEQ ID NO: 40. Le fragment *HindIII-SmaI* muté est recombiné dans *E. coli* avec pTG4609 linéarisé par *BstBI* (Chartier et al., 1996, J. Virol. 70, 4805-4810). Ce dernier contient le génome Ad5 complet comportant un site *BstBI* en position 32940 en aval du codon stop de la fibre.

La capacité à trimériser de la fibre modifiée est testée sur gel NDS-PAGE

(Novelli et Boulanger, J. of Biological Chemistry, 1991, 266, 9299-9303) à partir de la protéine produite par voie recombinante dans les cellules d'insectes Sf9 à l'aide d'un baculovirus recombinant portant les séquences correspondantes placées sous le contrôle du promoteur polyhédrine. En parallèle, la viabilité (ou capacité à se propager) des virions portant la fibre mutée est déterminée par transfection des cellules 293 et 293Fb+. Enfin, la liaison de la fibre aux récepteurs cellulaires MHC-I et CAR peut être étudiée dans des expériences de compétition d'infection d'un adénovirus recombinant Ad5-Luc sur les cellules Daudi-HLA+ et CHO-CAR (Bergelson et al., 1997, Science 275, 1320-1323). A titre indicatif, le virus Ad5Luc est un adénovirus compétent pour la réplication qui contient le gène luciférase placé sous le contrôle du promoteur précoce du virus SV40 (Virus simien 40) inséré dans la région E3 du génome adénoviral (Mittal et al., 1993, Virus Research 28, 67-90).

La fibre  $\Delta EF$  s'accumule sous forme de trimères, peut se propager dans les cellules 293 et 293Fb+ et n'est pas un compétiteur pour l'infection des cellules Daudi-HLA+ par l'Ad5Luc. Elle est capable d'inhiber partiellement l'infection des cellules CHO-CAR, mais moins efficacement que la fibre sauvage. Ceci suppose que les feuillets E et F sont importants pour l'attachement de l'Ad5 au récepteur MHC-I alors qu'il joue un rôle plus mineur, peut être de stabilisation dans la liaison au CAR. L'insertion d'un nouveau ligand devrait permettre de rediriger l'infectivité vers les cellules portant le récepteur reconnu par le ligand.

- 32 -

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATION GENERALE:

## (i) DEPOSANT:

(A) NOM: Transgene S.A  
(B) RUE: 11 rue de Molsheim  
(C) VILLE: Strasbourg  
(E) PAYS: France  
(F) CODE POSTAL: 67000  
(G) TELEPHONE: (33) 03 88 27 91 00  
(H) TELECOPIE: (33) 03 88 27 91 11

(A) NOM: Centre National de la Recherche Scientifique  
(CNRS)  
(B) RUE: 3 rue Michael Ange  
(C) VILLE: Paris  
(E) PAYS: France  
(F) CODE POSTAL: 75794 Cedex 16  
(G) TELEPHONE: (33) 01 44 96 40 00  
(H) TELECOPIE: (33) 01 44 96 50 00

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Fibre adenovirale modifiée et adenovirus cibles

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 40

## (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk  
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 581 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

## (vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Mastadenovirus  
(B) SOUCHE: adenovirus 5  
(C) INDIVIDUEL ISOLE: fibre Ad5

## (viii) POSITION DANS LE GENOME:

(B) POSITION SUR LA CARTE: 31063 a 33120 du genome Ad5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

- 33 -

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro  
 1 5 10 15  
 Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro  
 20 25 30  
 Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser  
 35 40 45  
 Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu  
 50 55 60  
 Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser  
 65 70 75 80  
 Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn  
 85 90 95  
 Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu  
 100 105 110  
 Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr  
 115 120 125  
 Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile  
 130 135 140  
 Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln  
 145 150 155 160  
 Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr  
 165 170 175  
 Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu  
 180 185 190  
 Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly  
 195 200 205  
 Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr  
 210 215 220  
 Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr  
 225 230 235 240  
 Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala  
 245 250 255  
 Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val  
 260 265 270  
 Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln  
 275 280 285  
 Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn  
 290 295 300

- 34 -

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu  
 305 310 315 320  
 Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile  
 325 330 335  
 Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro  
 340 345 350  
 Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp  
 355 360 365  
 Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp  
 370 375 380  
 Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr  
 385 390 395 400  
 Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu  
 405 410 415  
 Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile  
 420 425 430  
 Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile  
 435 440 445  
 Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn  
 450 455 460  
 Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe  
 465 470 475 480  
 Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly  
 485 490 495  
 Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala  
 500 505 510  
 Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys  
 515 520 525  
 Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp  
 530 535 540  
 Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly  
 545 550 555 560  
 His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser  
 565 570 575  
 Tyr Ile Ala Gln Glu  
 580

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

- 35 -

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 60 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (iii) ANTI-SENS: OUI

- (vi) ORIGINE:

- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese otg7000  
(code pour PSASASAPGS)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

AACGATTCTT TAGCTGCCGG GAGCAGAGGC GGAGGCGGAG GCGCTGGGTT CTTGGGCAAT 60

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 57 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (iii) ANTI-SENS: OUI

- (vi) ORIGINE:

- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese otg7001  
(code pour GRP)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

AACGATTCTT TACATCAGGT GGCCACAGC CCAGTGGTTT CCGCTGCCGG GAGCAGA 57

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (iii) ANTI-SENS: NON

- 36 -

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG10776

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

CCTTCCACGG GAAGATTGTA

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG10781

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GGGGTGTCTG TCTTCACACT

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 26 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11065

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

GGGAAGCTTG AGGTAACT AAGCAC

26

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 28 paires de bases

- 37 -

- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11066

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

GGGTCTAGAG CTGCCGGGAG CAGAGGCG

28

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11067

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GGGCTCGAGT TATGTTTCAA CGTGTTTAT

29

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11068

- 38 -

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

GTGCCCCGGG AGTTTATTAA TATC

24

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 31 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11069  
(clonage EGF)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

GCGTCTAGAA ATAGTGACTC TGAATGTCCC C

31

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 46 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11070  
(clonage EGF)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

GCGCTCGAGC ACAAACGATT CTTAGCGCA GTTCCACCA CTCAG

46

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 39 -

- (A) LONGUEUR: 42 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: adenovirus 5
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7414  
(deletion du feuillet D)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

TAGCACTCCA TTTTCGTCGG ATCCTTGAAC TGTTCAGAT AT

42

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 43 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: adenovirus 5 (Ad5)
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTGA  
(deletion de la boucle CD)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

CTTATAATAA GATGAGCACT GGATCCAGCC AAAACTGAAA CTG

43

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 45 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- 40 -

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: adenovirus 5 (Ad5)
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese cTGB  
(deletion boucle CD et f.D)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

GTAGCACTCC ATTTTCGTCG GATCCAACAG CCAAACTGA AACTG

45

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 88 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus humain Ad5 et Ad3
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11135  
(boucle CD5 en CD3)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

CGTCAAATCT TATAATAAGA TGAGCACTCA CGTTTTTGTT TTAAACAGG GTGTTGTAGT

60

CGCTAACAGC CAAAACTGAA ACTGTAGC

88

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 64 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- 41 -

- (A) ORGANISME: Adenovirus (Mastadenovirus)
- (B) SOUCHE: Adenovirus 3
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG10350  
(feuillet D5 en D3)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

GTAGCACTCC ATTTTCGTCA AAGTAGAGCT CCACGTTGAT ACTTTGAACT GTTCCAGATA 60  
TTGG 64

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 17:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 88 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: Mastadenovirus
  - (B) SOUCHE: Adenovirus Ad5 et Ad3
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11136  
(CD+D5 en CD+D3)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

CGTCAAAGTA GAGCTCCACG TTGATACTCA CGTTTTTGT TTTAAACAGG GTGTTGTAGT 60  
CGCTAACAGC CAAAACGTGAA ACTGTAGC 88

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 18:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 56 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: Mastadenovirus
  - (B) SOUCHE: Adenovirus 5
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTGC

- 42 -

(rempl. coude GSLA en DKLT)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

TTGAACTGTT CCAGATATTG GGGTCAGTTT GTCTTTAACA GCCAAACTG AAAC TG

56

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 48 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTGD  
(rempl. coude SGTV en DKLT)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

AATAAGATGA GCACTTTGGG TCAGTTTGTC TATTGGAGCC AAAC TGCC

48

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 44 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTGE  
(rempl. G443 en D)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

CCAGATATTG GAGCCAAACT GTCTTTAACA GCCAAACTG AAAC

44

- 43 -

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 21:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 42 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: Mastadenovirus
  - (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTGF  
(rempl. L445 en F)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

TGTTCAGAT ATTGGAGCGA AACTGCCTTT AACAGCCAAA AC

42

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 22:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 42 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: Mastadenovirus
  - (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTGG  
(rempl. G450 en N)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

ATGAGCACTT TGAAGTGTGT TAGATATTGG AGCCAAACTG CC

42

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 23:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 44 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

- 44 -

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: Mastadenovirus
  - (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTGH  
(rempl. T451 en K)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

TAAGATGAGC ACTTTGAACC TTTCCAGATA TTGGAGCCAA ACTG

44

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 24:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 45 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: Mastadenovirus
  - (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTGI  
(rempl. V452 en N)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:

CTTATAATAA GATGAGCACT TTGGTTTGTT CCAGATATTG GAGCC

45

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 25:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 48 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI

- 45 -

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTGJ  
(rempl. A455 en F)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:

GTCAAATCTT ATAATAAGAT GGAAACTTTG AACTGTTCCA GATATTGG

48

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 26:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 47 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

## (iii) HYPOTHETIQUE: NON

## (iii) ANTI-SENS: OUI

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTGK  
(rempl. L457 en K)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 26:

CCATTTTCGT CAAATCTTAT AATTTTATGA GCACTTTGAA CTGTTCC

47

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 27:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 46 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

## (iii) HYPOTHETIQUE: NON

## (iii) ANTI-SENS: OUI

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTGL  
(rempl. I459 en A)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 27:

- 46 -

GCACTCCATT TTCGTCAAAT CTAGCAATAA GATGAGCACT TTGAAC

46

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 26:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: Mastadenovirus
  - (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11102 (clonage hexon)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 28:

CGGTTTCATCC CTGTGGACCG TGA

23

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 29:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 38 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: Mastadenovirus
  - (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11103 (clonage hexon)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 29:

GGCCTCTAGA GTTGAGAAAA ATTGCATTTC CACTTGAC

38

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 30:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 23 paires de bases

- 47 -

- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11104  
(clonage hexon)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 30:

GGTATTGTAC AGTGAAGATG TAG

23

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 31:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11105

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 31:

CGTTGGAAGG ACTGTACTTT AGC

23

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 32:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 38 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

- 48 -

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Homo sapiens

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11106  
(clonage cDNA EGF)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 32:

CGCGTCTAGA GCGAATAGT GACTCTGAAT GTCCCTG

38

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 33:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 45 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Homo sapiens

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11107  
(clonage cDNA EGF)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 33:

CCACTGTACA ATACCACTTT AGGGCGCAGT TCCCACCACT TCAGG

45

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 34:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 21 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Mastadenovirus

(B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7171  
(deletion de la fibre)

- 49 -

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 34:

ATGGTTAACT TGCACCACTG C

21

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 35:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7275  
(deletion de la fibre)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 35:

GGGCTCGAGC TGCAACAACA TGAAGAT

27

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 36:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7276  
(deletion de la fibre)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 36:

CCGCTCGAGA CTCCTCCCTT TGTATCC

27

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 37:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 50 -

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7049  
(deletion de la fibre)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 37:

CTGCCCCGGA GTTATTAAT

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 38:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 42 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: adenovirus 5
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7416  
(deletion du feuillet H)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 38:

TGTTTCCTGT GTACCGTTGG ATCCTTTAGT TTTGTCTCCG TT

42

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 39:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 64 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

- 51 -

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Mastadenovirus

(B) SOUCHE: Adenovirus 3

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG10352  
(feuillet H5 en H3)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 39:

TGTTTCCTGT GTACCGTTTA GCATCACGGT CACCTCGAGA GGTTCAGTTT TGTCTCCGTT 60

TAAG 64

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 40:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 42 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Mastadenovirus

(B) SOUCHE: adenovirus 5

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese  
(deletion feuillets E et F)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 40:

TGTATAGGCT GTGCCTTCGG ATCCCCAATA TTCTGGGTCC AG 42

REVENDICATIONS

1. Fibre d'un adénovirus modifiée par mutation d'un ou plusieurs résidus de ladite  
5 fibre, caractérisée en ce que lesdits résidus sont dirigées vers le récepteur cellulaire naturel dudit adénovirus et compris entre la boucle CD et le feuillet  $\beta$  I de ladite fibre et, de préférence entre les boucles CD et DG.
2. Fibre d'un adénovirus selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est  
10 modifiée par mutation d'un ou plusieurs résidus compris entre la boucle CD et le feuillet  $\beta$  I de ladite fibre et, de préférence dans les feuillets E et F.
3. Fibre d'un adénovirus selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle dérive  
15 d'une fibre d'un adénovirus de type 5 (Ad5) comprenant tout ou partie de la séquence telle que montrée à l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO: 1) et qu'elle est modifiée par mutation d'un ou plusieurs résidus de la région comprise entre les résidus 441 et 557.
4. Fibre d'un adénovirus Ad5 selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle est  
20 modifiée par mutation d'un ou plusieurs résidus de la région comprise entre les résidus 441 à 478 de la SEQ ID NO: 1 et, de préférence, 443 à 462.
5. Fibre d'un Ad5 selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par  
25 mutation d'un ou plusieurs résidus de la région comprise entre les résidus 479 à 486 de la SEQ ID NO: 1.
6. Fibre d'un adénovirus Ad5 selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par substitution :

- 53 -

- du résidu glycine en position 443 par un résidu acide aspartique,
  - du résidu leucine en position 445 par un résidu phénylalanine,
  - du résidu glycine en position 450 par un résidu asparagine,
  - du résidu thréonine en position 451 par un résidu lysine,
  - 5 - du résidu valine en position 452 par un résidu asparagine,
  - du résidu alanine en position 455 par un résidu phénylalanine,
  - du résidu leucine en position 457 par un résidu alanine ou lysine, et/ou
  - du résidu isoleucine en position 459 par un résidu alanine.
- 10 7. Fibre d'un adénovirus Ad5 selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par substitution :
- du résidu glycine en position 443 par un résidu acide aspartique,
  - du résidu sérine en position 444 par un résidu lysine, et
  - du résidu alanine en position 446 par un résidu thréonine ;
- 15 ou
- du résidu sérine en position 449 par un résidu acide aspartique,
  - du résidu glycine en position 450 par un résidu lysine,
  - du résidu thréonine en position 451 par un résidu leucine, et
  - du résidu valine en position 452 par un résidu thréonine.
- 20
8. Fibre d'un adénovirus Ad5 selon la revendication 4 ou 5, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par délétion
- de la région s'étendant de la sérine en position 454 à la phénylalanine en position 461,
  - 25 - de la région s'étendant de la valine en position 441 à la glutamine en position 453,
  - de la région s'étendant de la valine en position 441 à la phénylalanine en position 461, ou

- 54 -

- de la région s'étendant de l'asparagine en position 479 à la thréonine en position 486.
9. Fibre d'un adénovirus selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle dérive  
5 d'une fibre d'un adénovirus de type 2 (Ad2) et qu'elle est modifiée par mutation d'un ou plusieurs résidus de la région comprise entre les résidus 441 et 558 de ladite fibre.
10. Fibre d'un adénovirus Ad2 selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'elle est  
10 modifiée par mutation d'un ou plusieurs résidus de la région comprise entre les résidus 441 à 478 et, de préférence, 451 à 466 de ladite fibre.
11. Fibre d'un Ad2 selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par  
15 mutation d'un ou plusieurs résidus de la région comprise entre les résidus 479 à 486 de ladite fibre.
12. Fibre d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que  
20 l'une au moins des modifications est une délétion d'au moins 3 résidus consécutifs d'une boucle et/ou d'un feuillet de ladite fibre et que lesdits résidus délétés sont remplacés par des résidus d'une boucle et/ou d'un feuillet équivalent dérivé d'une fibre d'un second adénovirus, notamment de type 3 ou 7, susceptible d'interagir avec un récepteur cellulaire différent dudit premier adénovirus.
13. Fibre d'un adénovirus caractérisée en ce qu'elle présente une capacité de liaison au  
25 récepteur cellulaire naturel substantiellement réduite et qu'elle est capable de trimériser.
14. Fibre d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisée en ce

- 55 -

qu'elle comprend en outre un ligand capable de reconnaître une molécule de surface cellulaire différente du récepteur cellulaire naturel dudit adénovirus.

- 5 15. Fibre d'un adénovirus selon la revendication 14, caractérisée en ce que le ligand est sélectionné parmi le groupe constitué par un anticorps, un peptide, une hormone, un polypeptide ou encore un sucre.
- 10 16. Fibre d'un adénovirus selon la revendication 14 ou 15, caractérisée en ce que le ligand est inséré à l'extrémité C-terminale de la fibre ou, lorsque l'une au moins des modifications est une délétion d'au moins 3 résidus consécutifs, en remplacement des résidus déletés.
- 15 17. Fragment d'ADN ou vecteur d'expression codant pour une fibre d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 16.
- 20 18. Lignée cellulaire caractérisée en ce qu'elle comprend soit sous forme intégrée dans le génome ou sous forme d'épisome un fragment d'ADN selon la revendication 17 placé sous le contrôle des éléments permettant son expression dans ladite lignée cellulaire.
- 25 19. Lignée cellulaire selon la revendication 18, caractérisée en ce en ce qu'elle est en outre capable de compléter un adénovirus déficient pour une ou plusieurs fonctions sélectionnées parmi les fonctions codées par les régions E1, E2, E4 et L1-L5.
20. Lignée cellulaire selon la revendication 18 ou 19, caractérisée en ce qu'elle dérive de la lignée 293.

21. Adénovirus caractérisé en ce qu'il est dépourvu d'une fibre native fonctionnelle et qu'il comprend une fibre selon l'une des revendications 1 à 16, ladite fibre selon l'une des revendications 1 à 16 pouvant être codée par le génome dudit adénovirus ou fournie *en trans* par une lignée cellulaire selon l'une des revendications 18 à 20.
- 5
22. Adénovirus caractérisé en ce qu'il est dépourvu d'une fibre fonctionnelle et qu'il comprend une fibre selon l'une des revendications 1 à 16 et un ligand capable de reconnaître une molécule de surface cellulaire différente du récepteur cellulaire naturel dudit adénovirus.
- 10
23. Adénovirus selon la revendication 22, caractérisé en ce que le ligand est sélectionné parmi le groupe constitué par un anticorps, un peptide, une hormone, un polypeptide ou encore un sucre.
- 15
24. Adénovirus selon l'une des revendications 22 et 23, caractérisé en ce que le ligand est inséré à l'extrémité C-terminale de la fibre ou, lorsque l'une au moins des modifications est une délétion d'au moins 3 résidus consécutifs, en remplacement des résidus délévés.
- 20
25. Adénovirus selon l'une des revendications 21 à 23, caractérisé en ce que le ligand est inséré dans une protéine de capsid autre que la fibre, notamment l'hexon ou le penton.
- 25
26. Adénovirus selon l'une des revendications 21 à 25, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus recombinant défectif pour la réplication.
27. Adénovirus selon la revendication 26, caractérisé en ce qu'il est délévé de tout ou partie de la région E1 et, optionnellement, de tout ou partie de la région E3.

28. Adénovirus selon la revendication 27, caractérisé en ce qu'il est en outre délété de tout ou partie de la région E2, E4 et/ou L1-L5.
- 5 29. Adénovirus selon l'une des revendications 26 à 28, caractérisé en ce qu'il comprend un gène d'intérêt sélectionné parmi les gènes codant pour une cytokine, un récepteur cellulaire ou nucléaire, un ligand, un facteur de coagulation, la protéine CFTR, l'insuline, la dystrophine, une hormone de croissance, une enzyme, un inhibiteur d'enzyme, un polypeptide à effet anti-tumoral, un polypeptide capable  
10 d'inhiber une infection bactérienne, parasitaire ou virale et, notamment le VIH, un anticorps, une toxine, une immunotoxine et un marqueur.
30. Procédé pour produire un adénovirus selon l'une des revendications 21 à 29, caractérisé en ce que :
- 15 - on transfecte le génome dudit adénovirus dans une lignée cellulaire appropriée,  
- on cultive ladite lignée cellulaire transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production dudit adénovirus, et  
- on récupère ledit adénovirus de ladite culture de ladite lignée cellulaire  
20 transfectée et, éventuellement, on purifie substantiellement ledit adénovirus.
31. Procédé pour produire un adénovirus dont le génome est dépourvu de tout ou partie des séquences codant pour une fibre, caractérisé en ce que :
- 25 - on transfecte le génome dudit adénovirus dans une lignée cellulaire selon l'une des revendications 18 à 20,  
- on cultive ladite lignée cellulaire transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production dudit adénovirus, et

- 58 -

- on récupère ledit adénovirus dans la culture de ladite lignée cellulaire transfectée et, éventuellement, on purifie substantiellement ledit adénovirus.

- 5 32. Cellule hôte infectée par un adénovirus selon l'une des revendications 21 à 29 ou susceptible d'être obtenu par un procédé selon la revendication 30 ou 31.
- 33. Composition pharmaceutique comprenant un adénovirus selon l'une des revendications 21 à 29 ou susceptible d'être obtenu par un procédé selon la  
10 revendication 30 ou 31 ou une cellule hôte selon la revendication 32 en association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique.
- 34. Utilisation thérapeutique ou prophylactique d'un adénovirus selon l'une des revendications 21 à 29 ou susceptible d'être obtenu par un procédé selon la  
15 revendication 30 ou 31 ou d'une cellule hôte selon la revendication 32, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 98/00668

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/34 C12N15/86 C07K14/075 C12N5/10 C12N7/00  
A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. GALL ET AL.: "Adenovirus type 5 and 7 capsid chimaera: Fiber replacement alters receptor tropism without affecting primary immune neutralization epitopes" JOURNAL OF VIROLOGY., vol. 70, no. 4, April 1996, pages 2116-2123, XP002050655 AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US see figure 1 ---	1,9,10, 14-19, 23-25
X	WO 96 26281 A (GENVEC, INC.) 29 August 1996 cited in the application see examples 2,5,7 ---	1,9,10, 14-19, 23-25
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art:

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 July 1998

Date of mailing of the international search report

04/08/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cupido, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00668

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 26412 A (THE UAB RESEARCH FOUNDATION) 5 October 1995 cited in the application see the whole document ---	13-21, 23-29
X	A. MCCLELLAND ET AL: "Modification of the adenovirus fiber protein for targeted gene delivery" JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY - SUPPLEMENT, 26 March 1995, page 411 XP000608380 see abstract ---	1,9,10
X	WO 95 05201 A (GENETIC THERAPY, INC.) 23 February 1995 cited in the application see examples 1-4 ---	11-21, 23-29
X	WO 94 17832 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 18 August 1994 see page 3, line 12 - page 4, line 11 -----	11-29

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/00668

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9626281 A	29-08-1996	US 5770442 A	23-06-1998
		AU 4980496 A	11-09-1996
		CA 2213343 A	29-08-1996
		EP 0811069 A	10-12-1997
WO 9526412 A	05-10-1995	AU 2195495 A	17-10-1995
		EP 0753068 A	15-01-1997
		JP 10501684 T	17-02-1998
WO 9505201 A	23-02-1995	US 5543328 A	06-08-1996
		EP 0696206 A	14-02-1996
		US 5756086 A	26-05-1998
WO 9417832 A	18-08-1994	AU 6133394 A	29-08-1994

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem : Internationale No

PCT/FR 98/00668

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/34 C12N15/86 C07K14/075 C12N5/10 C12N7/00  
A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	J. GALL ET AL.: "Adenovirus type 5 and 7 capsid chimaera: Fiber replacement alters receptor tropism without affecting primary immune neutralization epitopes" JOURNAL OF VIROLOGY., vol. 70, no. 4, avril 1996, pages 2116-2123, XP002050655 AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US voir figure 1	1,9,10, 14-19, 23-25
X	WO 96 26281 A (GENVEC, INC.) 29 août 1996 cité dans la demande  voir exemples 2,5,7 ----- -/-	1,9,10, 14-19, 23-25

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

28 juillet 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04/08/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5618 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Cupido, M

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem : Internationale No  
PCT/FR 98/00668

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 95 26412 A (THE UAB RESEARCH FOUNDATION) 5 octobre 1995 cité dans la demande voir le document en entier ---	13-21, 23-29
X	A. MCCLELLAND ET AL: "Modification of the adenovirus fiber protein for targeted gene delivery" JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY - SUPPLEMENT, 26 mars 1995, page 411 XP000608380 voir abrégé ---	1,9,10
X	WO 95 05201 A (GENETIC THERAPY, INC.) 23 février 1995 cité dans la demande voir exemples 1-4 ---	11-21, 23-29
X	WO 94 17832 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 18 août 1994 voir page 3, ligne 12 - page 4, ligne 11 -----	11-29

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. internationale No

PCT/FR 98/00668

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9626281 A	29-08-1996	US 5770442 A	23-06-1998
		AU 4980496 A	11-09-1996
		CA 2213343 A	29-08-1996
		EP 0811069 A	10-12-1997
WO 9526412 A	05-10-1995	AU 2195495 A	17-10-1995
		EP 0753068 A	15-01-1997
		JP 10501684 T	17-02-1998
WO 9505201 A	23-02-1995	US 5543328 A	06-08-1996
		EP 0696206 A	14-02-1996
		US 5756086 A	26-05-1998
WO 9417832 A	18-08-1994	AU 6133394 A	29-08-1994

**PCT**WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/85, 9/00, 15/86, 15/11, A61K</b> <b>31/70, 48/00</b>		<b>A2</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 98/48027</b>
			<b>(43) International Publication Date:</b> 29 October 1998 (29.10.98)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/US98/08003 <b>(22) International Filing Date:</b> 21 April 1998 (21.04.98)  <b>(30) Priority Data:</b> 60/044,492 21 April 1997 (21.04.97) US 60/046,146 9 May 1997 (09.05.97) US  <b>(71) Applicant:</b> UNIVERSITY OF FLORIDA [US/US]; 223 Grinter Hall, Gainesville, FL 32611 (US).  <b>(72) Inventors:</b> HAUSWIRTH, William, W.; 12001 S.W. 89th Street, Gainesville, FL 32608 (US). FLANNERY, John, G.; University of California, School of Optometry, Minor Hall, Berkeley, CA 94720-2020 (US).  <b>(74) Agents:</b> SALIWANCHIK, David, R. et al.; Saliwanchik, Lloyd & Saliwanchik, Suite A-1, 2421 N.W. 41st Street, Gainesville, FL 32606-6669 (US).		<b>(81) Designated States:</b> AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Published</b> <i>Without international search report and to be republished upon receipt of that report.</i>	
<b>(54) Title:</b> MATERIALS AND METHODS FOR TREATMENT OF RETINAL DISEASES			
<b>(57) Abstract</b>  The subject invention provides materials and methods for efficient, specific expression of proteins in retinal photoreceptors cells. Specifically, the constructs are composed of an adeno-associated viral vector contacting a rod or cone-opsin promoter. These materials and methods can be used in therapies for retinal diseases. In one embodiment, ribozymes which degrade mutant mRNA are used to treat retinitis pigmentosa.			

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						

DESCRIPTIONMATERIALS AND METHODS FOR  
TREATMENT OF RETINAL DISEASES

5

The subject invention was made with government support under a research project supported by NIH Grant Nos. EY07864 and EY11123 . The government has certain rights in this invention.

10

Cross-Reference to Related Applications

This application claims priority from provisional applications USSN 60/046,147, filed May 9, 1997; and USSN 60/044,492, filed April 21, 1997.

Background of the Invention

15

Retinitis pigmentosa (RP) is a collection of heritable retinal degenerations caused by defects in one of several genes for proteins of photoreceptor (PR) cells. RP is a clinically and genetically heterogeneous group of conditions characterized by progressive rod photoreceptor degeneration and eventual blindness. Of the nearly 100 causative gene defects currently known, all are either directly or indirectly involved in the rod cell specific visual response. The exact molecular pathogenesis of RP is still unexplained. Ultrastructural observations suggest that the rod PRs are severely affected in the disease. RP families have been documented with dominant, recessive, X-linked, and digenic patterns of inheritance, and more than fifteen separate loci have been implicated by linkage studies. Currently, the mutations identified to date all occur in genes exhibiting a PR-specific pattern of expression. Approximately 50,000 individuals in the United States are estimated to have RP.

20

25

Macular degeneration is a deterioration of the macula (the cone-rich center of vision) leading to gradual loss of central vision. Eventual loss of these cones leads to central vision loss and functional blindness. Macular degeneration may also have a genetic etiology or predisposition. Although a genetic etiology has not yet been established, based on pedigree studies it is very likely to exist. At least 500,000 individuals are estimated to suffer from macular degeneration currently in the United States.

30

There is currently no effective treatment for most forms of retinitis pigmentosa or macular degeneration. Treatment with a massive supplement (15,000 I.U. per day) of vitamin

A often retards the course of retinal degeneration in retinitis pigmentosa. Vitamin therapy does not treat the underlying cause of RP and is not a cure.

Recombinant AAV vectors have been reported to efficiently transduce central nervous system (Kaplitt, M., P. Leone, R. Samulski, X. Kigo, D. Pfaff, K. O'Mally, M. During (1993) *Nature Genetics* 8:148-154), lung (Aflone, S., C. Conrad, W. Kearns, S. Chunduru, R. Adams, T. Reynolds, W. Guggino, G. Cutting, B. Carter, T. Flotte (1996) *J. Virol.* 70:3235-3241; Flotte, T., S. Afione, C. Conrad, S.A. McGrath, R. Solow, H. Oka, P.R. Zeitlin, W.B. Guggino, C. Bi (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10613-10617), and muscle (Xiao, X., J. Li, R. Samulski (1996) *J. Virol.* 70:8098-8108; Kessler, P., G. Podsakoff, X. Chen, S. McQuilstron, P. Colosi, L. Matelis, G. Kurtzman, B. Byrne (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14082-14087). Although a recent report (Kido, M., K. Rich, G. Lang, E. Barron, D. Kohn, M. Al-Ubaidi, J. Blanks (1996) *Curr. Eye Res.* 15:333-344) describes using an opsin promoter in a recombinant retrovirus for *ex vivo* transduction of cultured cells, dislocated retinal cells and fetal mouse retinal explants, the efficiency was very low (ca. < 0.1%).

#### Brief Summary of the Invention

The subject invention concerns materials and methods for achieving expression of proteins in retina cells. The expression of proteins in retina cells can be used, for example, for the treatment of retinal diseases. More specifically, the subject invention provides polynucleotide sequences, and methods for using these sequences, to achieve highly specific expression of proteins in the retina. As described herein, the expression of these proteins can be used to treat a variety of retinal diseases. In an embodiment specifically exemplified herein, the materials and methods of the subject invention can be used to treat autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP).

In one embodiment, the subject invention provides techniques for obtaining targeted, high level expression of any desired gene in the photoreceptor cells of the retina. These methods involve the use of specific sets of promoter sequences that allow RNA transcription of the delivered gene exclusively in retinal rod and/or cone photoreceptor cells. Rods and cones are the principal cell types affected in retinitis pigmentosa and macular degeneration respectively, hence the ability to target expression of therapeutic genes to these cells without altering unaffected cell types in the retina provides a genetic therapy approach of high specificity and low risk.

In a specific embodiment of the subject invention, ribozymes can be highly and specifically expressed in the retina. The ribozymes cleave the mutant forms of messenger RNA

(mRNA) occurring in common forms of inherited retinal degeneration. This specificity makes these ribozymes able to destroy harmful mRNA while leaving normal mRNA intact. Ribozymes against other genetic forms of retinitis pigmentosa can be produced and used according to the subject invention. Other polynucleotides encoding therapeutically useful products can also be selectively expressed in the eye using the teachings of the subject invention.

#### Brief Summary of the Drawings

Figures 1a and 1b show the construction of plasmids used according to the subject invention. These figures show a schematic diagram of the plasmid DNA constructs used to make rAAV viruses mOp-*lacZ* (a) and mOp-*gfp* (b). TR, 145 bp AAV terminal repeat sequence, mOp, 472 bp murine rod opsin regulatory sequence from +86 to -388, SD/SA, 180 bp SV40 late viral protein gene 16S/19S splice donor and acceptor signal, *lacZ*; coding sequence for the bacterial *lacZ* gene; *gfp*, coding sequence for the synthetic green fluorescence gene; pA, pA1 and pA2, polyadenylation signals; Epo, a tandem repeat of the polyoma virus enhancer region (bases 5210-5274); Ptk, thymidine kinase promoter of herpesvirus (bases 92-218); neo<sup>r</sup>, coding sequence of the neomycin resistance gene, Tn5 (bases 1555-2347) (Zolotukhin, S., M. Potter, W. Hauswirth, J. Guy, N. Muzyczka (1996) *J. Virol.* 70:4646-4654).

Figures 2a-2b show outer retinal layer with P23H ribozymes. 2a, measurements of ONL thickness (left), RIS length (middle), and ROS length (right) in rats killed at different ages. Filled squares denote normal, non-transgenic animals. P23H-3 rats were either uninjected (open squares), injected subretinally with PBS (open diamonds), or injected with AAV vectors carrying one of five ribozymes or controls. Ribozymes were: Hp11 hairpin ribozyme (filled circles), Hh13 hammerhead ribozyme (filled triangles), Hp11i "inactive" hairpin ribozyme (open circles), Hh13i "inactive" hammerhead ribozyme (open triangle), or BOPS-*gfp* (X), all regulated by the same bovine opsin promoter. All injections were performed at P14-15. The error bars were omitted if they fell within the symbol, except for Hp11i at P75 and P90, where only one eye at each point was examined. 2b, Measurements of ONL thickness along the vertical meridian of the eye from the optic nerve head (ONH) to the ora serrata (anterior margin of the retina) in rats at P90. Rats were either uninjected (open triangles) or injected at P14-15 with Hp11 hairpin ribozymes (filled circles) or Hh13 hammerhead ribozymes (open circles).

#### Detailed Disclosure of the Invention

The subject invention pertains to materials and methods for achieving highly specific expression of desired proteins in the retina. These proteins can be used as described herein to

achieve a beneficial therapeutic affect. In one aspect, the subject invention provides materials and methods which can be used to reduce or eliminate the symptoms of inherited eye disease caused by mutations in genes for retinal proteins. To this end, the subject invention provides materials and methods for achieving efficient and cell type-specific expression of exogenous genes in photoreceptor cells (PRs) of the mammalian retina. In a specific embodiment of the subject invention, recombinant Adeno-associated Virus (rAAV) vectors can be used to transfer the desired genes to retina cells.

In a specific embodiment, the subject invention provides a method for treating autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP) at a molecular level. Gene therapy for ADRP according to the subject invention involves (1) an efficient and cell-type specific gene delivery/expression system, and (2) a selective means of inhibiting production of the mutant protein.

Provided herein are the results of experiments wherein rAAV vectors are used to transfer the bacterial *lacZ* gene or a synthetic green fluorescent protein gene (*gfp*) to mouse or rat retinas following injection into the subretinal space. These results demonstrate the surprising and advantageous ability to achieve highly specific expression of proteins in the mammalian retina. For example, employing a proximal murine rod opsin promoter (+86 to -385) to drive expression, reporter gene product was found exclusively in photoreceptors, not in any other retinal cell type or in the adjacent retinal pigment epithelium (RPE). GFP-expressing photoreceptors typically encompassed 10-20% of the total retinal area following a single 2  $\mu$ l injection. Both rod and cone photoreceptors were transduced with nearly 100% efficiency in the region directly surrounding the injection site. Approximately 2.5 million photoreceptors were transduced as a result of the single subretinal inoculation. The use of such proximal opsin promoters therefore can be used to substantially enhance the efficiency of expression in cases where rod and/or cone -specific expression of a potentially therapeutic gene is desired. The *gfp*-containing rAAV stock was substantially free of both adenovirus and wild-type AAV, as judged by plaque assay and infectious center assay, respectively. Thus, highly purified, helper virus-free rAAV vectors can achieve high frequency tissue-specific transduction of terminally differentiated, postmitotic photoreceptor cells. These methods can be used as described herein for gene therapy to treat retinal diseases.

In a preferred embodiment the human rod opsin, or cone opsin, promoter analogous to the mouse sequence would be used. The appropriate regions of the human sequence can be readily identified and used by the skilled artisan having the benefit of the instant disclosure.

Assuming a 20  $\mu$ l injection into the central human retina at the region of greatest rod density, approximately 8 million rods would be expected to be transduced in a focal region encompassing approximately 6% of the total retina. By transducing such an area of PRs it is possible to improve or delay retinal degenerations in a variety of inherited retinal diseases.

5           Currently, a number of PR genes of therapeutic potential have been identified experimentally by virtue of their involvement in recessive human retinal disease and by their ability at least to delay the course of recessive RP-like disease in animal models. These include PDE-B (Bennett, J., T. Tanabe, D. Sun, Y. Zeng, H. Kjeldbye, P. Gouras, A.M. Maguire (1996) *Nature Med.* 2:649-654; Lem, J., J. Flannery, T. Li, M. Applebury, D. Forber, M. Simon (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4422-4426) and peripherin/rds (Travis, G.H., K.R. Groshan, M. Lloyd, D. Bok (1992) *Neuron* 33:113-119). Also included in this list are more general cell survival-promoting factors such as bcl-2 (Chen, J., J. Flannery, M. LaVail, R. Steinberg, J. Xu, M.I. Simon (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7042-7047) and a variety of growth factors and neurotrophins (Faktorovitch, E., R.H. Steinberg, D. Yasumura, M. Matthes, M.M. LaVail (1990) 347:83-86). Thus, all forms of RP (Daiger, S., L. Sullivan, J. Rodriguez (1995) *Behav Brain Sci.* 18:452-467) described to date are potential candidates for therapy in this context.

          In one specific embodiment, the subject invention utilizes the catalytic properties of ribozymes. Ribozymes are enzymes comprised of ribonucleic acid (RNA). In nature, ribozymes conduct a variety of reactions involving RNA, including cleavage and ligation of polynucleotide strands. The specificity of ribozymes is determined by base pairing (hydrogen bonding) between the targeting domain of the ribozyme and the substrate RNA. This specificity can be modified by altering the nucleotide sequence of the targeting domain. The catalytic domain of ribozymes, the part that actually performs the biochemical work, can also be changed in order to increase activity or stability of the ribozyme.

25           Utilizing the techniques of the subject invention, ribozymes are continuously produced in the retinal cells from a copy of the ribozyme integrated in the patient's DNA. In a preferred embodiment patients require a single intra-ocular injection and do not require hospitalization. Long term (more than 15 months) unattenuated expression of proteins has been observed in cells transformed as described herein.

30           In one embodiment the subject invention concerns synthetic genes for several ribozymes. These ribozymes can recognize, for example, the nucleotide change causing the P23H mutation in one form of ADRP and the S334ter mutation in another. Genes can be constructed which encode ribozymes having the ability to specifically destroy target RNA's for mutant retina proteins. With the benefit of the teachings provided herein, the skilled artisan can

construct genes encoding ribozymes which destroy mutant RNA molecules associated with human RP or other genetic retinal diseases.

Using a recombinant Adeno-associated virus (rAAV) in which expression is driven by a portion of the rod opsin promoter, we have achieved photoreceptor-specific expression of reporter genes in mouse and rat by ocular injection. The cone opsin promoter can also be used to drive expression selectively in photoreceptor cells. The delivery-expression materials and methods of the subject invention can be used to replace any gene responsible for photoreceptor disease. Specific examples include the genes responsible for retinitis pigmentosa or macular degeneration. General survival-promoting genes such as growth factor and neurotrophin genes are also candidates for both recessive and dominant forms of retinal disease. Finally, genes for agents such as ribozymes or triplex-forming oligonucleotides that can be designed to eliminate specific genetic defects are candidates for treating retinal disease using this technique. Assays for activity include morphological analysis of retinal degeneration, quantitative mRNA studies, and electroretinography.

#### Materials and Methods

rAAV plasmid construction. The mOp-*lacZ*-rAAV plasmid DNA was made by first inserting the 4.3 kbp Bgl II/Bam HI fragment containing the proximal murine rod opsin promoter (+86 to -385) and the entire *lacZ* gene of clone pRG3 (Lem, J., M. Applebury, J. Falk, J. Flannery, M. Simon (1991) *J. Biol. Chem.* 266:9667-9672) into the Bgl II sites of pTR which contains the AAV TR sequences and a SV40 polyadenylation sequence (Fig. 1a). The mOp-*gfp*-rAAV plasmid DNA was made by first adding Not I linkers to the 472bp Bgl II/Xho I proximal opsin promoter fragment of pRG3 and inserting it into the Not I sites of pTRUF2 (Zolotukhin, S. M. Potter, W. Hauswirth, J. Guy, N. Muzyczka (1996) *J. Virol.* 70:4646-4654) (Fig. 1b).

rAAV virus production and analysis. To generate recombinant virus, human 293 cells were co-transfected with mOp-*lacZ*-rAAV or mOp-*gfp*-rAAV plasmid DNA and the helper pIM45 plasmid DNA carrying the wtAAV genome without terminal repeats (Zolotukhin, S. M. Potter, W. Hauswirth, J. Guy, N. Muzyczka (1996) *J. Virol.* 70:4646-4654). Cultures were then infected with helper Adenovirus, Ad-ts149 for the *lacZ* virus or with Ad5 for the *gfp* virus, at a multiplicity of infection of 10 rAAV and wtAAV titers were determined by infectious center assay (McLaughlin, S. P. Collis, P. Hermonat, N. Muzyczka (1988) *J. Virol.* 62:1963-1973), which is independent of the transgene or opsin promoter used. Titters of contaminating adenovirus were determined by plaque assay for mOp-*gfp*-rAAV and by serial dilution

cytopathic effect for mOp-lacZ-rAAV. Adenovirus was not detectable in either of the rAAV preparations.

5        Subretinal injection of rAAV. Thirty adult C57BL/6I (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) pigmented mice between 3 and 6 months of age and 27 adult albino Sprague-Dawley rats between 3 and 4 months of age were used. Animals were anesthetized by ketamine/xylazine injection, eyes were dilated (2.5% phenylephrine and 0.5% tropicamide) and a local anesthetic (proparacain Hcl) was applied. Injections (1  $\mu$ l in mice and 2  $\mu$ l in rats) were made into the right eye with blunt 32 gauge needle through an opening in the pars-plana, delivering the rAAV suspension into the superior subretinal space. Control injections were made in the contralateral eye with PBS only. Injections were performed with an operating microscope and the subretinal location of the injected volume was confirmed by ophthalmoscopy.

10        Tissue analysis. Animals were euthanized by intramuscular injection of ketamine, followed by phenobarbital overdose. The eyes were immediately enucleated and the site of virus injection marked. The cornea, lens and vitreous of each eye were removed and the posterior eyecup placed in primary fixative.

15        For  $\beta$ -galactosidase staining, eyecups were fixed in 0.5% glutaraldehyde in 0.1M Cacodylate buffer pH 7.5 for 15 min. At room temperature. Following a 10 min. Wash in PBS, the eyecups were incubated in an iron-based X-gel staining solution (Sanes, J., J. Rubenstein, J. Nicolas (1986) *EMBO J.* 5:3133-3142) in a shaking water bath at 35°C for 12 hours. For agarose embedment, retinas were detached from the RPE, submerged without dehydration in molten 5% agarose and cooled to 25°C. Retinas were sectioned in the transverse axis in isotonic PBS on a vibratome at 50-100  $\mu$ m. Bright field and phase-contrast micrographs of whole mounts and  $\beta$ -galactosidase-stained sections were made with a Zeiss Axiophot.

20        GFP fluorescence was examined in retinal whole mounts and agarose embedded sections. Tissue fixation was minimized to reduce retinal autofluorescence. Retinas were detached from eyecups, fixed for 15 min. At room temperature in 4% formaldehyde, 0.1 M PO<sub>4</sub> buffer pH 7.5, and rinsed three times in PBS. Whole mounts were photographed with epifluorescence using Zeiss filter set 09 (ex. 450-490 nm, barrier 510 nm, emission 520 nm) and an AttoArc (Carl Zeiss, Inc., New York) variable output UV lamp to minimize GFP bleaching. Whole mount retinas were then embedded in agarose as above for 100  $\mu$ m transverse vibratome sections, and fluorescence was documented as for the whole mount. Higher resolution images were collected with a Molecular Dynamics confocal microscope (Nikon 40X or 60X 1.4 n.a. oil objectives; argon laser excitation at 514 nm, emission at 520-560 nm). Optical sections were

made in 0.32  $\mu\text{m}$  steps. Full frame (768 x 512) 8-bit images were collected and processed with Adobe Photoshop. Area measurements were made with NIH Image analysis software (Rasband, W. D. Bright (1995) *Microbeam Analysis Society Journal* 4:137-149).

5 Expression of the *lacZ* reporter gene in murine retinal cells was analyzed by reverse transcriptase PCR (RT-PCR). Pieces of retina (1mm<sup>2</sup>), were detached from unfixed eyecups and dissected free of RPE, homogenized with a pestle fitted to a 1.5 ml tube and total RNA isolated using the trizol reagent (phenol-guanidine isothiocyanate, Gibco-BRL, Gaithersburg, MND) according to the manufacturer's recommendations. The RNA was additionally purified over an RNA-easy spin column (Qiagen, Chatsworth, CA). The RT-PCR employed a two buffer  
10 thermostable Tth polymerase system (Promega, Madison, WI) according to manufacturer's instructions and *lacZ* sequence primers from nucleotides 105 to 124 (forward) and 303 to 286 (reverse). Rnase and Dnase digestions prior to the RT-PCR were performed as previously described (van Ginkel, P., W. Hauswirth (1994) *J. Biol. Chem.* 269:4986-4992).

15 Following are examples which illustrate procedures for practicing the invention. These examples should not be construed as limiting. All percentages are by weight and all solvent mixture proportions are by volume unless otherwise noted.

#### Example 1 – Design of rAAV Vectors for Gene Transfer to Photoreceptors

20 To express a foreign gene specifically in the mammalian PR by AAV-mediated delivery, a 472bp of the proximal murine rod opsin promoter (+86 to -385) was linked to a *lacZ*-SV40 polyA reporter gene and then inserted this into pTR. The gene construct was packaged into AAV virus particles, concentrated, tested for contaminating Adenovirus and titered for recombinant AAV by an infectious center assay. The right eyes of 30 C57Bl/6J mice were  
25 injected sub-retinally with 1 $\mu\text{l}$  of mOp-*lacZ* virus (10<sup>7</sup> iu per ml). After two weeks, the right (test) and left (control) eyes of 12 animals were removed, fixed and stained with X-gal. Test retina in 6 of 12 injected eyes exhibited a focal blue region consistent with a subretinal bleb of the injected virus creating a localized retinal detachment. All control eyes showed no X-gal reaction. Reporter gene expression was examined in mice sacrificed at later periods and was  
30 detected at 10 weeks post-injection suggesting persistent reporter transgene expression.

#### Example 2 – Lac-Z and GFP Reporter Genes are Expressed Exclusively in Photoreceptors

The distribution of *lacZ* gene product was analyzed at higher resolution by preparing serial 50  $\mu\text{m}$  transverse sections from the entire whole mounts. The blue X-gal reaction product

is observed primarily in the PR inner segments. Most of the PRs were filled with X-gal in this region. X-gal staining was slightly above control levels in the PR synaptic termini in the outer plexiform layer. PR outer segments, RPE and other retinal cells in this region did not reveal X-gal staining above baseline levels observed in identically treated, uninjected or PBS-injected control retinas from the contralateral eye. Examination of additional transverse sections confirmed that the region of positive staining radiated outward from the injection site in a progressively reducing fraction of PR inner segments until baseline levels were seen. The area of X-gal positive PRs was consistent with the blue area in the whole-mount view. Neural retina and RPE were separated and analyzed independently to control for the possibility that the  $\beta$ -galactosidase enzyme or its X-gal reaction product was transferred from transduced RPE cells to PRs. Total mRNA was extracted from neural retina, and RPE from injected animals and tested for the presence of *lacZ* mRNA by RT-PCR. The 199bp amplification product diagnostic for *lacZ* RNA (nucleotides 105 to 303) can be seen when total RNA from a portion of a mouse retina sacrificed at 2 weeks post-injection is amplified. The amplification template was a cellular RNA because of its resistance to Dnase pretreatment and sensitivity to Rnase pretreatment. The remaining RPE tissue was negative for this RT-PCR product. This demonstrates that the observed X-gal product was derived from  $\beta$ -galactosidase expression within PR cells and not derived from RPE expression.

A second reporter gene, a synthetic version of the A victoria green fluorescent gene (*gfp*) (Zolotukhin, S. M. Potter, W. Hauswirth, J. Guy, N. Muzyczka (1996) *J. Virol.* 70:4646-4654) was used to independently confirm the apparent cell-type specificity of transduction. The same murine rod opsin promoter was used as well as an analogous rAAV vector to construct the mOp-*gfp* virus (Fig. 1b). Two  $\mu$ l of *gfp*-containing rAAV was injected into the subretinal space of 8 Sprague-Dawley rats. Rats were used in place of mice because the larger eye allowed more reproducible subretinal inoculations. Retinal whole mounts prepared from all eight rat eyes that were injected contained a fluorescent region of superior retina surrounding the site of inoculation. GFP fluorescence typically extended over 10-20% of the retinal area in a radial pattern from the injection site. Immediately surrounding the point of infection, the transduction frequency, as judged by the intensity of GFP fluorescence, was very high, with a continuous positive signal. In transverse sections extending from the central retina to the periphery, beyond a region of apparently saturated GFP fluorescence, the percentage of transduced cells decreased radially with distance from the injection site. GFP-positive cells were easily identifiable as PRs by their specialized shape and location in the retina. Hence, only PR cells appeared to have been transduced, i.e., infected by the rAAV and expressing the *gfp* passenger gene.

### Example 3 – Opsin Promoter Confers Photoreceptor Cell Specificity

The PR-specific pattern of GFP expression was confirmed by laser confocal microscopy. GFP was not observed between the inner limiting membrane (vitreal face of the inner retina) and the outer plexiform layer (OPL) (junction of the inner retina with PR synaptic termini). This region contains all the non-PR retinal neuronal (bipolar, horizontal, amacrine, and ganglion) and glial (Müller) cells. Virtually 100% of the PR inner segments, cell bodies, and synaptic terminals exhibited strong GFP fluorescence. In regions more peripheral to the injection site, the fraction of positive PRs was substantially reduced, consistent with the radial decline in fluorescence seen in retinal whole mounts. It was established that all PR cell bodies contained GFP signal by examining serial optical sections (0.32  $\mu\text{m}$ ). Through-focus series demonstrated that occasional, dark regions in the ONL always contained a gfp-positive PR cell body in another plane of section. Therefore, all PRs, including both rods and cones, supported reporter gene expression. Outer segments demonstrated less fluorescence than other PR compartments, near the level of autofluorescence seen in control outer segments. No GFP signal was observed in the REP, choroid, or sclera.

### Example 4 – rAAV Transduces PRs with High Efficiency

The area of GFP-positive PRs resulting from a typical injection from epifluorescence images of retinal whole mounts was established. GFP-positive areas were measured with NIH Image software by segmenting the image into regions of GFP fluorescence and background on the basis of gray level. Area measurements were calibrated by imaging a 1000  $\mu\text{m}$  reference scale on the film together with the whole mount.

The retinal area that contained 50% or more PR cells positive for GFP signal in whole mounts was measured. On average, the GFP-positive area covered ~35% of the total retinal area of the rat retina. The number of GFP-positive PRs resulting from a typical injection was estimated by examining serial optical sections taken through the retina. Serial confocal images suggest 100% PR transduction in the region directly adjacent to the injection site, since we did not observe GFP-negative cell bodies within the outer nuclear layer in adjacent confocal optical sections. It is estimated that the whole rat retina contains 15.7 million PR cells. From these observations, a conservative estimate is that 2-3 million PRs were transduced by the gfp-containing rAAV. Since there were 9.2 million infectious rAAV particles in the 2- $\mu\text{l}$  injection volume, one PR cell was transduced for every 3-4 rAAV injected, a 25% transduction efficiency.

Example 5 – Construction of Vectors and Expression in Target Cells

rAAV-ribozyme constructs. Recombinant AAV constructs were based on the pTR-UF2 vector (Zolotukhin, S., M. Potter, W.W. Hauswirth *et al.* [1996] *J. Virol.* 70:4646-4654). They resemble the vector used by Flannery *et al.* (Flannery, J.G., S. Zolotukhin, M.I. Vaquero *et al.* [1997] *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:6916-6921) to direct GFP expression to rat photoreceptors except that a 691 bp fragment of the proximal bovine rod opsin promoter replaced the 472 bp murine rod opsin promoter and the ribozyme gene replaced the *gfp* gene. The bovine promoter fragment contains three proximal promoter elements and the endogenous transcriptional start site at its 3' end (DesJardin, L.E., W.W. Hauswirth [1996] *Inv. Ophthalm. Vis. Sci.* 37:154-165) and supports high efficiency, rat photoreceptor-specific expression *in vivo*. Active and inactive ribozymes were designed, tested and cloned. Each ribozyme gene was followed by an internally cleaving hairpin ribozyme derived from plasmid pHC (Altschuler, M., R. Tritz, A.A. Hampel [1992] *Gene* 122:85-90) resulting in ribozyme cassettes of 140-152 bp. Self cleavage at the internal cutting site in the primary ribozyme RNA leaves identical 3' ends on each mature ribozyme. The ribozyme cassette was preceded by an intron derived from SV40 and followed by a polyadenylation signal in order to promote nuclear export of the ribozyme. Recombinant AAV titers were determined using both an infectious center assay (Flannery, J.G., Zolotukhin, S. Vaquero *et al.* [1997] *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:6916-6921) and a DNase resistant physical particle assay employing a quantitative, competitive PCR of the *neo'* gene contained within all rAAV-ribozyme particles (Zolotukhin, S., M. Potter, W.W. Hauswirth *et al.* [1996] *J. Virol.* 70:4646-4654). Each of the four rAAV-ribozyme virus preparations contained  $10^{10}$  to  $10^{11}$  DNase resistant particles per ml and  $10^8$  to  $10^9$  infectious center units per ml. Contaminating helper adenovirus and wild-type AAV, assayed by serial dilution cytopathic effect or infectious center assay respectively, were less than five order of magnitude lower than rAAV.

Subretinal injection of rAAV. Line 3 albino transgenic rats (P23H-3) on an albino Sprague-Dawley background (produced by Chrysalis DNX Transgenic Sciences, Princeton, NJ) were injected at the ages of P14 or P15. Animals were anesthetized by ketamine/xylazine injection, and a direction, and b-waves were measured from the cornea-negative peak to the major cornea-positive peak. For quantitative comparison of differences between the two eyes of rats, the values from all the stimulus intensities were averaged for a given animal.

Retinal tissue analysis. The rats were euthanized by overdose of carbon dioxide inhalation and immediately perfused intracardially with a mixture of mixed aldehydes (2% formaldehyde and 2.5% glutaraldehyde). Eyes were removed and embedded in epoxy resin, and

1  $\mu\text{m}$  thick histological sections were made along the vertical meridian (26). Tissue sections were aligned so that the ROS and Müller cell processes crossing the inner plexiform layer were continuous throughout the plane of section to assure that the sections were not oblique, and the thickness of the ONL and lengths of RIS and ROS were measured as described by Faktorovich  
5 *et al.* (Faktorovich, E.G., R.H. Steinberg, D. Yasamura *et al.* [1990] *Nature* 347:83-86). Briefly, 54 measurements of each layer or structure were made at set points around the entire retinal section. These data were either averaged to provide a single value for the retina, or plotted as a distribution of thickness or length across the retina. The greatest 3 contiguous values for ONL thickness in each retina were also compared to determine if any region of retina (*e.g.*, nearest  
10 the injection site) showed proportionally greater rescue; although most of these values were slightly greater than the overall mean of all 54 values, they were no different from control values than the overall mean. Thus, the overall mean was used in the data cited, since it was based on a much larger number of measurements.

**RT-PCR.** For quantification of opsin mRNA retina from ribozyme injected or control  
15 eyes, retina were isolated without fixation and total RNA immediately extracted using the RNeasy Minikit (Qiagen, Santa Clarita, CA). RT-PCR was performed using the Pharmacia First-Strand cDNA synthesis kit employing oligo dT as the primer. Wild-type and transgene opsin cDNAs were amplified using a three primer system described above. Primers specific for  $\beta$ -actin cDNA (Timmers, A.M., B.R. Newton, W.W. Hauswirth [1993] *Exp. Eye Res.* 56:251-  
20 265) were included in each reaction for internal standardization.

Such constructs result in persistent photoreceptor expression of the passenger gene of greater than 15 months. Ribozymes were designed to recognize and cleave the unique transcript produced by the P23H transgene. The mutant target sequence "5'-UCGGAGUCUACUUCG-3'" (SEQ ID NO. 17) contains two differences from the wild-type mRNA (indicated in bold). The  
25 hairpin ribozyme (Hp11) cleaved 3' to the first adenosine residue (underlined) and the hammerhead ribozyme (Hh13) cleaved 3' to the central cytosine residue (underlined). Control ribozymes (Hp11i and Hh13i, respectively) retained the targeting domains but contained fatal flaws in their catalytic domains. *In vitro*, the active hammerhead ribozyme (Hh13) was able to cleave 20% of the P23H target within 10 min. of incubation and by 5 hours greater than 80%  
30 was converted to the expected products. In multiturnover experiments, both ribozymes exhibited kinetic constants ( $K_m$  and  $k_{cat}$ ) similar to those of naturally occurring ribozymes. The two active ribozymes produced negligible cleavage of the wild-type transcript even in the presence of high  $\text{MgCl}_2$  concentrations. Control ribozymes (Hp11i and Hh13i) containing inactivating mutations in their catalytic domains were without measurable activity on any substrate. Using total RNA

derived from retinas of P23H rats on P62, both the hairpin and the hammerhead ribozymes were able to cleave the mRNA product of the mutant transgene selectively.

For experiments *in vivo*, a line of transgenic rats, TgN(P23H)3 (abbreviated P23H-3), that has a retinal degeneration phenotype similar to patients with retinitis pigmentosa (Steinberg, R.H., J.G. Flannery, M.I. Naash *et al.* [1996] *Inv. Ophthalm. Vis. Sci.* 37:S698) was used. Expression of the mutated opsin transgene begins at about postnatal day (P) 5 in rats, leading to a gradual death of photoreceptor cells. These rats develop an apparently normal retina up to P15, although there are somewhat more pyknotic photoreceptor nuclei in the outer nuclear layer (ONL) than in non-transgenic control rats. Thereafter, death of photoreceptor cells is almost linear until about P60, resulting in loss of about 40% of the photoreceptors. After P60, the rate of cell loss decreases, until by one year the retinas have less than a single row of photoreceptor nuclei. The rAAV-ribozyme vector was injected into the interphotoreceptor space between the photoreceptors and the adjacent retinal pigment epithelium at P14 or P15. Rats were sacrificed and eyes examined at 3 time points between P60-P90. At these ages in uninjected control eyes of P23H-3 rats, the ONL thickness, which is an index of photoreceptor cells number, was reduced to about 60% of normal.

Ribozyme-injected eyes showed a modest but significant decrease in the accumulation of transcript derived from the P23H transgene. Control eyes exhibited little variation in the level of transgene opsin mRNA. Eyes injected with either active ribozyme uniformly exhibited lowered transgene mRNA levels relative to total opsin mRNA in the same eye. Retinas receiving the hairpin ribozyme Hp11 showed a  $15.3 \pm 3.3\%$  decrease in transgene expression, and those with the hammerhead ribozyme Hh13 showed a decrease of  $11.1 \pm 5.1\%$  decrease.

Histologically, eyes injected with the ribozymes retained significantly more photoreceptors at P60, P75 and P90 than uninjected contralateral control eyes. Retinas receiving a subretinal injection of Hh13 at P14-15 retained 88% of the normal ONL thickness, compared to about 60% in the uninjected controls (Figure 2a). Thus, the ONL thickness after Hh13 expression was 40-43% greater than that of uninjected P23H-3 controls (Figure 2b), a highly significant difference ( $p=0.001$  or less at P60 and P90). Injection of the Hp11 ribozyme also resulted in significant rescue when compared to controls, with preservation of 77-83% of normal ONL thickness (Figure 2a). Thus, the ONL thickness after Hp11 expression was 30-39% greater than that of uninjected P23H-3 controls (Figure 2b), a highly significant difference ( $p<0.0005$  at all ages).

There was little or no rescue in PBS-injected control eyes ( $p>0.169$  in all cases) as shown in Figure 2a. As a control for possible rescue by the expression of the bovine opsin

promoter (BOPS), AAV-BOPS-*gfp* was injected at a titer of  $1.75 \times 10^8$ , similar to the titer used with the AAV-ribozymes. The injection of AAV-BOPS-*gfp* did not rescue photoreceptors (Figure 2a). The inactive Hp11i did yield ONL thickness measures greater than uninjected control values, but they were consistently less than that resulting from the active Hp11 and Hh13 ribozymes (Figure 2a).

The pan-retinal extent of photoreceptor rescue that resulted from a single 2- $\mu$ l injection of the rAAV suspension was surprising (Figure 2b). From photoreceptor counts, it is estimated that there are approximately  $10^7$  photoreceptors in the rat retina. Recombinant AAV titers were estimated using both an infectious center assay and a physical particle assay. Together they permit construction of upper and lower bounds for the number of functional rAAV particles in a single 2  $\mu$ l injection. The upper bound derives from the DNase resistant particle assay, indicating that 2  $\mu$ l of the rAAV-ribozyme virus preparation contained  $2 \times 10^7$  to  $10^8$  rAAV. This is an upper bound because not all particles counted are expected to be infectious. The lower bound for rAAV titer is generated by the infectious center assay, indicating  $10^6$  to  $10^7$  rAAV per  $\mu$ l.

The lateral extent of rescue resulting from a single injection may also be explained by the unique nature of the retinal tissue. For *in vivo* delivery to the photoreceptors, rAAV is injected into extracellular space separating the photoreceptor and retinal pigment epithelium (RPE) layers. The initial volume of extracellular space, approximately 0.5  $\mu$ l, increases greatly with the 2  $\mu$ l injection. Following injection, the fluid transport function of the RPE dehydrates this space, reapposing the photoreceptors and RPE and concentrating the rAAV. The detachment of the photoreceptors from the RPE resolves within several hours. During the reattachment process, viral particles are spread laterally through the subretinal space.

Along with the survival of more photoreceptor cells, injection of the ribozymes resulted in greater lengths of rod inner segments (RIS) and rod outer segments (ROS). In the case of RIS, the uninjected control retinas had RIS that were about 90% of normal. Both the active and inactive ribozymes resulted in RIS lengths of 98% or greater of the normal length, and about 10-15% longer than uninjected controls. The PBS and AAV-BOPS-*gfp* were indistinguishable from uninjected eyes. The ROS lengths were about 15-25% longer in the ribozyme-injected eyes compared to those in the uninjected control eyes. However, ROS in the ribozyme-injected eyes were, at greatest, only 65-75% of normal, compared to the virtually normal RIS lengths. The ROS of the active ribozymes differed significantly from the uninjected controls ( $p < 0.005$  for all, except  $< 0.02$  for Hp11 at P90), as did the inactive Hp11i ( $p < 0.05$ ).

The finding that ribozyme-targeted destruction of P23H mutant RNA markedly slows the rate of retinal degeneration in P23H transgenic rats, along with functional preservation of the retina, is the first demonstration of this therapeutic approach in an animal model of a dominantly inherited human disease. Furthermore, because complete removal of mutant rRNA  
5 is not necessary to achieve phenotypic rescue, this approach can be applied to other dominantly inherited diseases as well.

It should be understood that the examples and embodiments described herein are for illustrative purposes only and that various modifications or changes in light thereof will be  
10 suggested to persons skilled in the art and are to be included within the spirit and purview of this application and the scope of the appended claims.

Claims

- 1           1. A method for expressing a polynucleotide at high levels specifically in photoreceptor  
2           cells wherein said method comprises administering to said photoreceptor cells a construct  
3           comprising said polynucleotide wherein said polynucleotide is under the control of a promoter  
4           sequence which directs expression only in said photoreceptor cells.
- 1           2. The method, according to claim 1, wherein said cells are rod cells.
- 1           3. The method, according to claim 1, wherein said cells are cone cells.
- 1           4. The method, according to claim 1, wherein the promoter is a rod opsin promoter.
- 1           5. The method, according to claim 1, wherein the promoter is a cone opsin promoter.
- 1           6. The method, according to claim 1, wherein said polynucleotide sequence is delivered  
2           to said retina cells by subretinal injection.
- 1           7. The method, according to claim 1, wherein said polynucleotide sequence is delivered  
2           using a recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV).
- 1           8. The method, according to claim 1, which is used to treat retinal disease.
- 1           9. The method, according to claim 8, wherein said retinal disease is selected from the  
2           group consisting of Retinitis Pigmentosa and Macular Degeneration.
- 1           10. A construct for expressing a polynucleotide sequence selectively in photoreceptor  
2           cells wherein said construct comprises said polynucleotide sequence under the control of a  
3           promoter which directs expression selectively in photoreceptor cells.
- 1           11. The construct, according to claim 10, wherein said promoter is a rod opsin  
2           promoter.

1           12. The construct, according to claim 10, which comprises a recombinant Adeno-  
2           Associated Virus (rAAV).

1           13. The construct, according to claim 10, wherein said polynucleotide sequence is for  
2           the treatment of a retinal disease.

1           14. The construct, according to claim 13, wherein said retinal disease is selected from  
2           the group consisting of Retinitis Pigmentosa and Macular Degeneration.

1           15. The construct, according to claim 10, wherein said promoter is a rod opsin  
2           promoter.

1           16. The construct, according to claim 10, wherein said promoter is a cone opsin  
2           promoter.

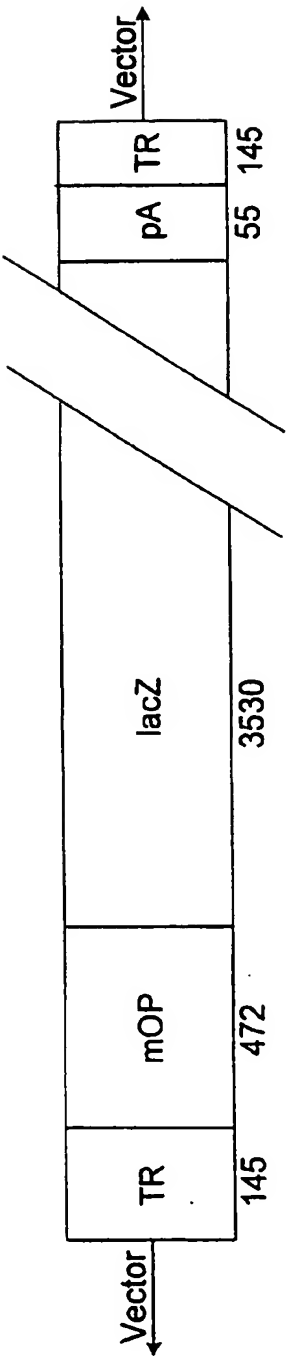


FIG. 1A

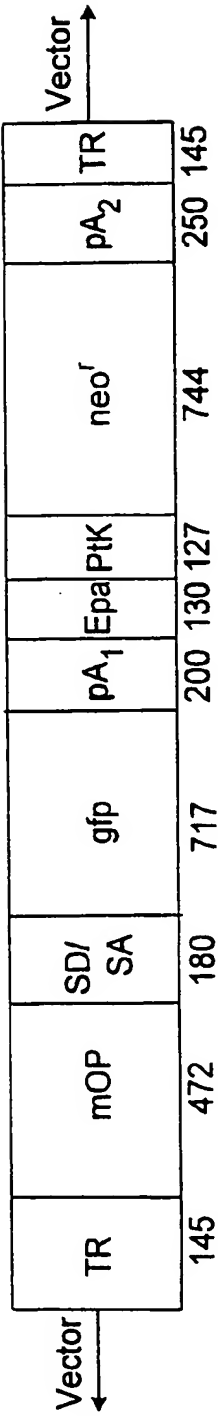
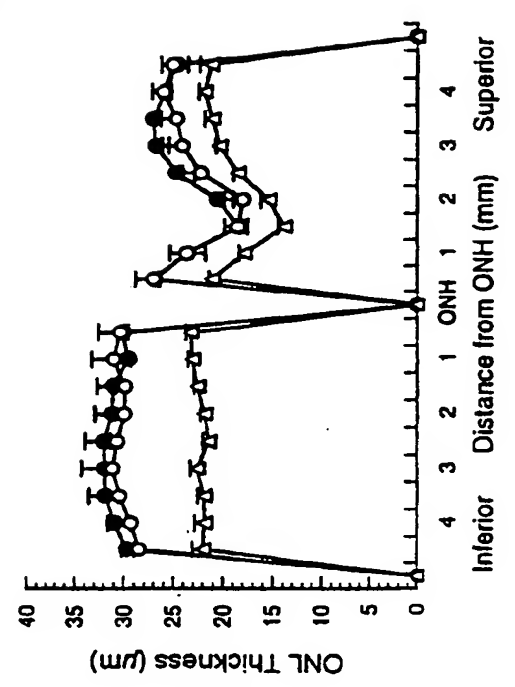
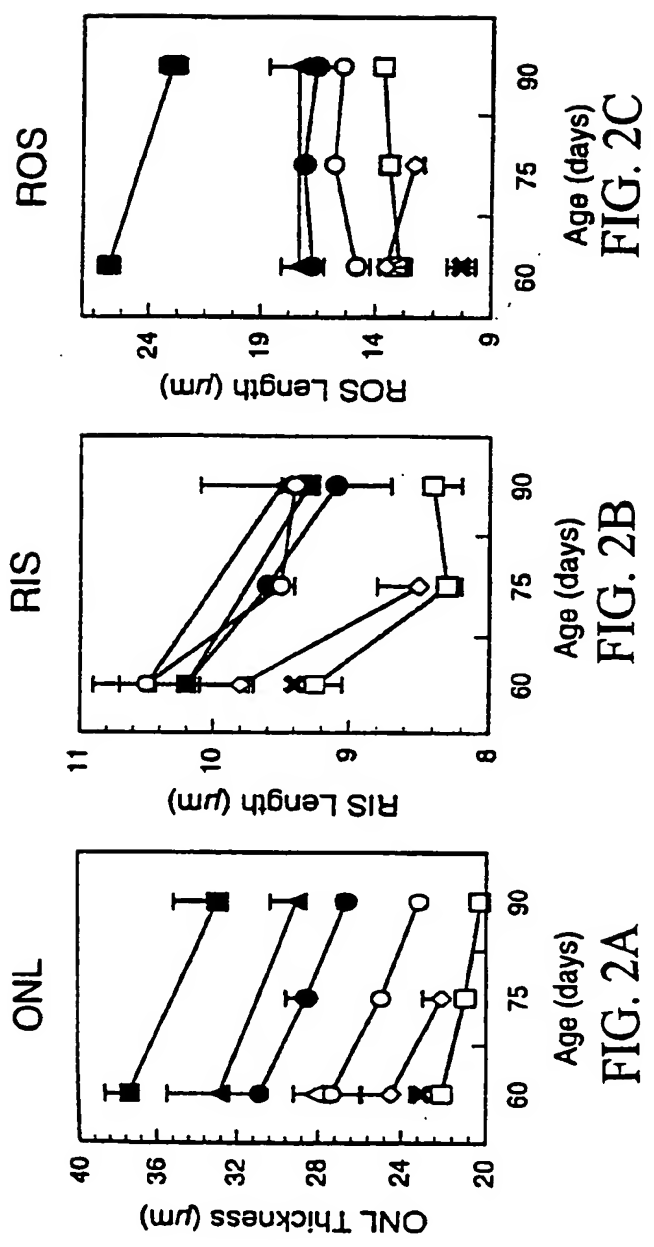


FIG. 1B



**PCT**

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/85, 15/11, 9/00, A61K 31/70,</b> <b>C12N 15/86, A61K 48/00</b>	<b>A3</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 98/48027</b> <b>(43) International Publication Date:</b> 29 October 1998 (29.10.98)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/US98/08003 <b>(22) International Filing Date:</b> 21 April 1998 (21.04.98)  <b>(30) Priority Data:</b> 60/044,492                      21 April 1997 (21.04.97)                      US 60/046,146                      9 May 1997 (09.05.97)                      US  <b>(71) Applicant:</b> UNIVERSITY OF FLORIDA [US/US]; 223 Grinter Hall, Gainesville, FL 32611 (US).  <b>(72) Inventors:</b> HAUSWIRTH, William, W.; 12001 S.W. 89th Street, Gainesville, FL 32608 (US). FLANNERY, John, G.; University of California, School of Optometry, Minor Hall, Berkeley, CA 94720-2020 (US).  <b>(74) Agents:</b> SALIWANCHIK, David, R. et al.; Saliwanchik, Lloyd & Saliwanchik, Suite A-1, 2421 N.W. 41st Street, Gainesville, FL 32606-6669 (US).		<b>(81) Designated States:</b> AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Published</b> <i>With international search report.</i> <i>Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>  <b>(88) Date of publication of the international search report:</b> 25 March 1999 (25.03.99)
<b>(54) Title:</b> MATERIALS AND METHODS FOR TREATMENT OF RETINAL DISEASES  <b>(57) Abstract</b>  The subject invention provides materials and methods for efficient, specific expression of proteins in retinal photoreceptor cells. Specifically, the constructs are composed of an adeno-associated viral vector containing a rod or cone-opsin promoter. These materials and methods can be used in therapies for retinal diseases. In one embodiment, ribozymes which degrade mutant mRNA are used to treat retinitis pigmentosa.		

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 98/08003

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/85 C12N15/11 C12N9/00 A61K31/70 C12N15/86  
A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AL-UBAIDI, M. ET AL.: "Photoreceptor degeneration induced by the expression of simian virus 40 large tumor antigen in the retina of transgenic mice" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 89, February 1992, pages 1194-1198, XP002077349	1,2,4, 10,11,15
Y	WASHINGTON US see the whole document  --- -/--	3,5-9, 12-14,16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 February 1999

Date of mailing of the international search report

16.02.99

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Andres, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 98/08003

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>RAYMOND, P. ET AL.: "Expression of rod and cone visual pigments in goldfish and zebrafish: a rhodopsin-like gene is expressed in cones."            NEURON,            vol. 10, June 1993, pages 1161-1174,            XP002091806            see the whole document</p>	3,5,16
Y	<p>HAUSWIRTH W W ET AL: "Adeno-associated virus delivery of an opsin promoter driven reporter gene to the mouse and rabbit retina."            GENE THERAPY 2 (SUPPL. 1). 1995. PAGE S2,            ABSTRACT 6., XP002077250            see abstract            &amp; THIRD MEETING OF THE EUROPEAN WORKING GROUP OF HUMAN GENE TRANSFER AND THERAPY, BARCELONA, SPAIN, NOVEMBER 17-20, 1995.,</p>	6,7,12
Y	<p>WO 97 11169 A (TRINITY COLLEGE DUBLIN ;FARRAR GWENYTH JANE (IE); HUMPHRIES PETER) 27 March 1997            see page 7, line 31 - page 8, line 10            see page 16, line 20 - page 17, line 33            see page 23, line 32 - page 24, line 27            see examples 1,2</p>	8,9,13,14
X	<p>KIDO, M. ET AL.: "Use of a retroviral vector with an internal opsin promoter to direct gene expression to retinal photoreceptor cells"            CURRENT EYE RESEARCH,            vol. 15, 8 August 1996, pages 833-844,            XP002077350            cited in the application            see the whole document</p>	1,7,10,12
X	<p>CHIU M I ET AL: "A SEQUENCE UPSTREAM OF THE MOUSE BLUE VISUAL PIGMENT GENE DIRECTS BLUE CONE - SPECIFIC TRANSGENE EXPRESSION IN MOUSE RETINAS"            VISUAL NEUROSCIENCE, (JUL/AUG 1994) VOL. 11, NO. 4, PP. 773-780., XP002091807            see the whole document</p>	1,3,10
A	<p>ZOLOTHUKIN, S. ET AL.: "A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high level expression in mammalian cells."            JOURNAL OF VIROLOGY,            vol. 70, no. 7, July 1996, pages 4646-4654, XP002047302            cited in the application            see the whole document</p>	1-7,10-16

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national Application No

PCT/US 98/08003

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CHEN J ET AL: "The human blue opsin promoter directs transgene expression in short-wave cones and bipolar cells in the mouse retina."            PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1994 MAR 29) 91 (7) 2611-5., XP002091808            see the whole document            ----</p>	1,3,5
A	<p>DESJARDIN, L. &amp; HAUSWIRTH, W.:            "Developmentally important DNA elements within the bovine opsin upstream region."            INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY &amp; VISUAL SCIENCE, (JAN 1996) VOL. 37, NO. 1, PP. 154-165., XP002077351            ----</p>	
A	<p>DAIGER, S. ET AL.: "Correlation of phenotype with genotype in inherited retinal degeneration."            BEHAVIORAL AND BRAIN SCIENCES, vol. 18, 1995, pages 452-467, XP002077238            ----</p>	
P,X	<p>FLANNERY J G ET AL: "Efficient photoreceptor -targeted gene expression in vivo by recombinant adeno-associated virus."            PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1997 JUN 24) 94 (13) 6916-21., XP002077239            cited in the application            see the whole document            ----</p>	1,2,4, 7-15
P,X	<p>LI, Q. ET AL.: "Cone-specific gene transfer and expression using human red/green opsin promoter in a recombinant AAV"            IOVS 39 (4). PAGE S721. ABSTRACT 3311-8137, March 1998, XP002091809            see abstract            -----</p>	1,3, 5-10, 12-14,16

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 98/08003

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 1-5 and 7 (as far as in vivo methods are concerned) and claims 6, 8 and 9 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1,6-10,12-14 (all partially) and claims 2,4,11, 15 (totally)

A method for expressing a polynucleotide at high levels specifically in rod cells using a rod opsin promoter, and its use in treatment of retinal diseases.

2. Claims: 1,6-10,12-14 (all partially) and claims 3,5, 16 (totally)

A method for expressing a polynucleotide at high levels specifically in cone cells using a cone opsin promoter, and its use in treatment of retinal diseases.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 98/08003

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9711169 A	27-03-1997	AU 7089696 A	09-04-1997
		CA 2232738 A	27-03-1997
		EP 0851918 A	08-07-1998
-----			